



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 749**

51 Int. Cl.:
C07K 14/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03769251 .4**

96 Fecha de presentación : **29.10.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1558640**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.08.2005**

54 Título: **Proteínas de unión triméricas para citocinas triméricas.**

30 Prioridad: **29.10.2002 DK 2002 01634**
29.10.2002 US 421807 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2011

73 Titular/es: **ANAPHORE, Inc.**
9393 Towne Centre Drive, Suite 120
San Diego, California 92121, US

72 Inventor/es: **Holtet, Thor, Las;**
Andersen, Mikkel, Holmen y
Ottow, Helle, Krogh

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 749 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de unión triméricas para citocinas triméricas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la disposición de proteínas de unión triméricas que se unen a citocinas triméricas. En particular se proporciona agentes de unión triméricos que se unen de tal manera que tras la unión, todos los sitios de unión a receptor de la citocina trimérica se bloquean sustancialmente, y por tanto la actividad biológica potencial de la citocina trimérica se suprime. En un aspecto, la invención se refiere a agentes de unión triméricos que pueden unirse a citocinas de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral, que incluye factor de necrosis tumoral (TNF).

Antecedentes de la invención y técnica anterior

Las citocinas son pequeños polipéptidos segregados de eucariotas superiores que son responsables de la transducción de señales intercelulares y que afectan al crecimiento, división y funciones de otras células. Son polipéptidos potentes, pleiotrópicos que, por ejemplo por medio de receptores correspondientes, actúan como factores reguladores intercelulares locales o sistémicos, y por tanto desempeñan papeles cruciales en muchos procesos biológicos, tales como inmunidad, inflamación y hematopoyesis (formación y desarrollo de células sanguíneas en la médula ósea). Las citocinas se producen mediante diversos tipos celulares que incluyen fibroblastos, células endoteliales, macrófagos/monocitos y linfocitos. Hasta el momento se han identificado un gran número de citocinas, incluyendo interferones, factores de necrosis tumoral, interleucinas y linfocinas. Se diferencian de las hormonas clásicas porque se producen por varios tejidos o tipos de células distintas de las glándulas especializadas.

La modulación de las interacciones citocina-receptor puede ser un mecanismo útil para la intervención terapéutica en diversas enfermedades y patologías. Las proteínas de unión solubles, que pueden interactuar con citocinas, pueden secuestrar potencialmente la citocina alejándola del receptor, reduciendo o previniendo de ese modo la activación de esa ruta de receptor particular.

Ciertas citocinas se producen como complejos de múltiples subunidades que contienen múltiples copias de la misma subunidad. El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y proteínas dentro de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNFLSF), tal como el factor de necrosis tumoral (TNF; miembro 2 de TNFLSF) y linfotóxina alfa (LT-alfa; miembro 1 de TNFLSF), se producen como homotrímeros formados por tres subunidades idénticas. Se sabe que muchas de estas citocinas triméricas están implicadas en la transducción de señales y actúan como factores reguladores, y que están implicadas en muchos tipos diferentes de enfermedades e indicaciones médicas.

Se sabe que las citocinas triméricas de la superfamilia de ligandos del TNF controlan y organizan las respuestas inmunitarias e inflamatorias a varios niveles. Se sabe también que los miembros de la superfamilia de ligandos del TNF están asociados con varias afecciones patológicas, tales como afecciones inflamatorias agudas o crónicas. Actualmente, la superfamilia de ligandos del TNF tiene al menos 17 ligandos reconocidos, que incluyen LTA (linfotóxina alfa; miembro 1 de TNFLSF), TNF (factor de necrosis tumoral; miembro 2 de TNFLSF), LTB (linfotóxina beta; miembro 3 de TNFLSF), OX-40L (miembro 4 de TNFLS); CD40L (miembro 5 de TNFLS); FasL (miembro 6 de TNFLS); CD27L (miembro 7 de TNFLS); CD30L (miembro 8 de TNFLS); 4-1 BB-L (miembro 9 de TNFLS); TRAIL (miembro 10 de TNFLS); RANKL (miembro 11 de TNFLS); TWEAK (miembro 12 de TNFLS); APRIL (miembro 13 de TNFLS); BAFF (miembro 13B de TNFLS); LIGHT (miembro 14 de TNFLS); VEGI (miembro 15 de TNFLS); y GITRL (miembro 18 de TNFLS).

Existen pruebas de que la unidad de señalización de las citocinas triméricas de la superfamilia de ligandos del TNF y sus correspondientes receptores, se encuentra en la forma de tres receptores y tres ligandos ensamblados como complejo hexamérico en el que un único trímero de citocina se une a tres moléculas de receptor (Bodmer *et al.* 2002, TRENDS in Biochemical Sciences 27(1), pág. 19-26). Antes de formar parte de este complejo hexamérico, los receptores existen en forma monomérica. Este mecanismo general se ilustra en la figura 1.

El TNF (miembro 2 de TNFLSF) es uno de los mediadores principales de la respuesta inmunitaria e inflamatoria, y se sabe, por ejemplo, que tiene un papel importante en la patogénesis de la artritis reumatoide, que es una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria común que afecta aproximadamente al 0,5-1% de la población humana. Adicionalmente, también se sabe que el TNF está implicado en la patogénesis de una amplia gama de estados patológicos, que incluyen choque endotóxico, malaria cerebral y reacción injerto frente a huésped. El TNF se produce por varios tipos de células, principalmente por macrófagos activados. La forma soluble de TNF está constituida por tres subunidades de proteína de 17 kD idénticas, mientras que la forma unida a membrana está constituida por tres subunidades de 26 kD idénticas. El TNF se conoce también previamente como "TNF-alfa" y "caquectina".

Wüest *et al.* (Oncogene vol. 21, n.º 27 pág. 4257-4265) se refieren a proteínas de fusión triméricas que comprenden TNF y un dominio de trimerización. Peng *et al.* (J.Virology vol. 73, n.º 6 pág. 5098-5109) dan a conocer las proteínas

de fusión TNFR-CD8.

Se encontró recientemente que TWEAK (miembro 2 de TNFLSF) es un inductor directo y fuerte de la angiogénesis (formación y crecimiento de vasos sanguíneos) tal como se observó que las concentraciones picomolares de TWEAK promueven la proliferación de células endoteliales normales y que TWEAK induce angiogénesis en un modelo de córnea de rata *in vivo* (Lynch *et al.*, 1999, *The Journal of Biological Chemistry*, 274(13) pág. 8455-8459). En particular, la angiogénesis es esencial para el crecimiento y persistencia de tumores sólidos y sus metástasis, y se sabe también que está implicada en otras afecciones patológicas tales como retinopatía diabética, psoriasis, dermatitis por contacto y restenosis.

El documento US5716805 se refiere a un procedimiento para preparar proteínas oligoméricas solubles.

10 En el documento US20020037852A1 se describió la citocina trimérica BAFF (miembro 13B de TNFLS) que se expresaba por células T y células dendríticas para el fin de la coestimulación de células B y por consiguiente puede desempeñar un papel importante en el control de la función de las células B. Se sugiere en el mismo que BAFF y su receptor pueden tener aplicaciones anticancerígenas e inmunorreguladoras así como usos para el tratamiento de trastornos inmunosupresivos tales como VIH.

15 Drickamer, Kurt (*Current Opinion in Structural Biology*, vol. 9, n.º 5) da a conocer las formas triméricas de CTLD en relación con tetranectina.

20 APRIL (miembro 13 de TNFLS) es una citocina trimérica que se une al receptor TNFRSF13B y al TNFRSF17. Se ha demostrado recientemente que la adición de APRIL recombinante a diversas células tumorales estimula su proliferación y por tanto APRIL puede estar implicada en la regulación del crecimiento de células tumorales (Hahne M., *et al*, 1998; *J. Exp. Med.* 188: 1185-1190). Se ha sugerido también que APRIL puede estar implicada en procesos inmunológicos mediados por monocitos/macrófagos.

Además, se ha descrito también que las citocinas dentro de la superfamilia de TNF están implicadas en enfermedades hereditarias tales como el síndrome de hiper IgM, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario tipo I, síndrome de fiebre periódica asociada a TNF-R1, displasia ectodérmica hipohidrótica y osteólisis familiar expansiva.

25 Se han realizado varios intentos con el fin de encontrar y desarrollar antagonistas y agentes de unión adecuados para citocinas triméricas que pueden unirse a citocinas triméricas específicas y pueden evitar por tanto que las citocinas triméricas se unan a por ejemplo receptores unidos a la membrana celular y por tanto pueden suprimir la activación de esa ruta de receptor particular.

30 Un ejemplo es antagonistas frente a la citocina trimérica TNF (miembro 2 de TNFLSF). Actualmente, dos tipos de antagonistas de TNF están comercialmente disponibles, concretamente Infliximab (Remicade) y Eterncept (Enbrel) que han recibido ambos la autorización de comercialización en los Estados Unidos y Europa para el tratamiento de artritis reumatoide. Los dos productos han demostrado también que son eficaces para el tratamiento de psoriasis y enfermedad de Chron. Infliximab es un anticuerpo quimérico con regiones variables murinas y regiones constantes de IgG1 y ? humanas, que neutraliza la actividad biológica de TNF mediante la unión a las formas solubles y transmembranas de TNF e inhibe la unión de TNF con sus receptores. La estructura de Infliximab es similar a la de los anticuerpos que se producen de manera natural. Eterncept es una proteína de fusión constituida por el dominio extracelular del receptor p75 TNF y los dominios de bisagra y Fc de IgG1 humana.

40 Otro ejemplo de un antagonista para una citocina trimérica se proporciona en el documento WO 00/42073 en el que se da a conocer un anticuerpo monoclonal frente a la citocina trimérica TWEAK (miembro 12 de TNFLS). Se menciona que el anticuerpo puede bloquear el desarrollo de la enfermedad de injerto frente a huésped.

45 Sin embargo, un problema técnico común que se encuentra con los agentes de unión y productos inhibidores conocidos actualmente para las citocinas triméricas, es que tras la formación de un complejo 1:1 de la citocina trimérica y el agente de unión o producto inhibidor, no se bloquean de manera eficaz los tres sitios de unión a receptor de las citocinas triméricas, ya que al menos uno o dos de los tres sitios de unión a receptor se dejan abiertos. El(los) sitio(s) de unión a receptor de citocina abierto(s) puede(n) asociarse con un correspondiente receptor de citocina de superficie celular y por tanto, debido a la alta concentración local de los receptores en la superficie celular, inician el reclutamiento adicional de receptores de citocina y median la señalización de receptores.

50 El problema se ilustra claramente mediante el agente de unión a TNF Eterncept, que es una molécula bivalente que forma un complejo 1:1 con el trímero de TNF. Cuando Eterncept se une a TNF, sólo dos de tres posibles sitios de unión a receptor se ocupan por la molécula Eterncept, y el tercer sitio de unión a receptor se deja abierto. Esto implica que el sitio de unión a receptor de TNF abierto puede asociarse con un receptor de TNF de superficie celular y de ese modo, debido a la alta concentración local de los receptores en la superficie celular, inicia el reclutamiento adicional de receptores TNF y mediante esto la transducción de señales. Este problema se ilustra en la figura 2.

55 El mismo problema se observa con el agente de unión a TNF Infliximab. Cada molécula de Infliximab puede unirse sólo a un sitio de unión a receptor (subunidad) de una molécula de TNF dada, dejando por tanto dos sitios de unión a receptor abiertos. Estos sitios de unión a receptor abiertos pueden asociarse posteriormente con correspondientes

receptores libres, dando como resultado el reclutamiento adicional de receptores de TNF y la señalización de receptores.

Se ha encontrado ahora mediante los presentes inventores, que los problemas técnicos anteriores pueden superarse mediante la disposición de una proteína de fusión (protómero) que se construye como una fusión de una unidad de unión (agente de unión) para citocinas triméricas a un dominio de trimerización. La proteína de fusión de la presente invención, puede formar, como proteína trimérica, un complejo 1:1 con una citocina trimérica y preferentemente al mismo tiempo pueden unirse eficazmente los tres sitios de unión a receptor de las citocinas triméricas, mediante lo cual ningún sitio de unión a receptor se deja abierto, y por tanto puede inhibir el acoplamiento de la citocina a la superficie celular. Por tanto, se proporciona ahora una proteína de fusión que tiene la ventaja de poder inhibir y neutralizar de manera más eficaz la actividad biológica de citocinas triméricas en comparación con antagonistas de citocina trimérica conocidos actualmente. Una ventaja adicional de la proteína de fusión según la invención es que cuando se aplica como fármaco, se requiere menos cantidad de la proteína de fusión con el fin de obtener un efecto terapéutico, en comparación con los agentes de unión conocidos actualmente para citocinas triméricas.

Sumario de la invención

Por consiguiente, la invención se refiere en un primer aspecto a un polipéptido trimérico que comprende tres monómeros, comprendiendo cada uno de dichos monómeros un miembro de unión específico que puede unirse a una citocina trimérica, y comprendiendo cada uno de dichos monómeros un dominio de trimerización derivado de tetranectina.

En un aspecto adicional se proporciona una composición farmacéutica que comprende el polipéptido trimérico según la invención.

Todavía en un aspecto adicional, la invención se refiere a un polipéptido trimérico según la invención para su uso como fármaco.

Finalmente, se proporciona un procedimiento para la preparación del polipéptido trimérico según la invención, y un procedimiento de ensayo para detectar una citocina polipeptídica trimérica en una muestra.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona agentes de unión triméricos que pueden unirse a citocinas triméricas, preferentemente de tal manera que tras la unión, todos los sitios de unión a receptor de la citocina trimérica se bloquean sustancialmente y/o se neutralizan, y por tanto la actividad biológica potencial de la citocina trimérica se suprime o se neutraliza. Por consiguiente, se proporciona un polipéptido trimérico que comprende tres monómeros, en el que cada uno de los monómeros comprende un miembro de unión específico que puede unirse a una citocina trimérica, y en el que cada uno de los monómeros comprende un dominio de trimerización, derivado de tetranectina.

En el presente contexto, la expresión "citocina trimérica" se refiere a proteínas pequeñas y fragmentos de las mismas, que se producen y segregan por una célula, y que provocan una respuesta específica en una célula que tiene un receptor para esa citocina, por ejemplo afectando al crecimiento, división y/o función de la célula. El término "trimérica" se usa en el presente documento para describir que las citocinas según la invención se producen como complejos de múltiples subunidades que contienen tres subunidades, preferentemente tres subunidades idénticas (homotrímero).

Ciertos ejemplos típicos de tales citocinas triméricas incluyen factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF) y citocinas dentro de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNFLSF). Actualmente, según se mencionó anteriormente, la superfamilia de ligandos del TNF tiene al menos 17 ligandos reconocidos que comparten todos un dominio C terminal trimérico conservado conocido como "dominio de homología de TNF" (THD), que es el responsable de la unión a receptor. La identidad de secuencia de este dominio trimérico es aproximadamente un 20-30% entre los miembros de la familia de TNF. El THD es una secuencia larga de 150 aminoácidos que contiene una estructura conservada de residuos aromáticos e hidrófobos que se ilustra en la figura 2 en Bodmer *et al.* 2002, TRENDS in Biochemical Sciences 27(1), pág. 19-26. Por consiguiente, en el presente contexto un "miembro de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral" pretende significar una proteína trimérica que comprende el dominio de homología de TNF, THD. Las citocinas triméricas actualmente conocidas dentro de la superfamilia de ligandos del TNF se enumeran a continuación en la tabla 1, junto con sinónimos y sus correspondientes ID de Genbank (GenBank, National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). La nomenclatura para la superfamilia de ligandos del TNF tal como se usa en el presente documento sigue la nomenclatura de la superfamilia del TNF (TNFSF) oficial que puede encontrarse en <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/tnftop.html>.

TABLA 1: Superfamilia de ligandos del TNF

| Símbolo de ligando | ID de Genbank | Sinónimos |
|--------------------|---------------|--|
| LTA | X01393 | TNFSF1, TNFB, LT |
| TNF | X02910 | TNFSF2, TNF-alfa, DIF |
| LTB | L11016 | TNFSF3, TNFC, p33 |
| TNFSF4 | D90224 | OX-40L, gp34, TXGP1 |
| TNFSF5 | X67878 | CD40LG, IMD3, HIGM1, CD40L, hCD40L, TRAP, CD154, gp39 |
| TNFSF6 | U11821 | FasL, APT1LG1 |
| TNFSF7 | L08096 | CD70, CD27L, CD27LG |
| TNFSF8 | L09753 | CD30LG |
| TNFSF9 | U03398 | 4-1BB-L |
| TNFRSF10 | U37518 | TRAIL, Apo-2L, TL2 |
| TNFSF11 | AF013171 | TRANCE, RANKL, OPGL, ODF |
| TNFSF12 | AF030099 | TWEAK, DR3LG, AP03L |
| TNFSF13 | NM_003808 | APRIL |
| TNFSF13B | AF136293 | BAFF, THANK, BLYS, TALL-1, TALL1, TNFSF20 |
| TNFSF14 | AF036581 | LIGHT, LTg, HVEM-L |
| TNFRSF Fn14 | - | Proteína 14 de respuesta inmediata-temprana inducible por el factor de crecimiento de fibroblastos, 14 inducible por FGF, receptor Tweak, TweakR |
| TNFSF15 | AF039390 | TL1, VEGI |
| TNFSF18 | AF125303 | AITRL TL6 nGITRL |

5 Por consiguiente, en una realización útil de la invención el polipéptido trimérico según la invención puede unirse a una citocina trimérica que es un miembro de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral seleccionado de LTA; TNF ;LTB; TNFSF4; TNFSF5; TNFSF6; TNFSF7; TNFSF8; TNFSF9; TNFSF10; TNFSF11; TNFSF12; TNFSF13; TNFSF13B; TNFSF14; TNFRSF Fn14; TNFSF15; y TNFSF18.

10 La expresión "miembro de unión específico", según se usa en el presente documento, se refiere a un miembro de un par de moléculas que tienen especificidad de unión entre sí. Los miembros de un par de unión específica pueden derivarse de manera natural o pueden producirse de manera completa o parcialmente sintética. Un miembro del par de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, que se une específicamente a y es por tanto complementaria a una organización polar y espacial particular del otro miembro del par de moléculas. De ese modo, los miembros del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. Ciertos ejemplos de tipos de pares de unión específica son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, ligando-receptor de ligando, enzima-sustrato. Otros ejemplos de pares de unión específica incluyen, hidratos de carbono y lectinas, 15 secuencias de nucleótidos complementarias (que incluyen secuencias de ácidos nucleicos de sonda y captura usadas en ensayos de hibridación de ADN para detectar una secuencia de ácido nucleico diana), secuencias peptídicas complementarias que incluyen las formadas mediante procedimientos recombinantes, moléculas efectoras y receptoras, cofactores enzimáticos y enzimas, inhibidores enzimáticos y enzimas y similares. Además, los pares de unión específica pueden incluir miembros que son análogos o fragmentos del miembro de unión 20 específico original.

En realizaciones útiles, los miembros de unión específica que pueden unirse a una citocina trimérica, dotan al polipéptido trimérico según la invención de una afinidad de unión (Kd) por la citocina trimérica que preferentemente es 1×10^{-8} M o menos determinada mediante resonancia de plasmón de superficie. En otras realizaciones útiles, el valor de Kd es menor de 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, 1×10^{-13} M, 1×10^{-14} M, o incluso menor de

- 1 x 10⁻¹⁵ M. En otras realizaciones útiles, la constante K-off para el polipéptido trimérico según la invención es menor de 1 x 10⁻³ S⁻¹, tal como menor de 1 x 10⁻⁴ S⁻¹, incluyendo menor de 1 x 10⁻⁵ S⁻¹, e incluso menor de 1 x 10⁻⁶ S⁻¹ determinada mediante resonancia de plasmón de superficie. El término "K-off", según se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación para la disociación de un miembro de unión específico del complejo de miembro de unión específico/citocina trimérica. La expresión "resonancia de plasmón de superficie", según se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteína dentro de una matriz biosensora, por ejemplo usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). Para descripciones adicionales, véase el ejemplo 10.
- 5
- 10 Según se mencionó anteriormente, se prefiere que el agente de unión a citocina trimérica bloquee, inhiba o neutralice, según la invención, al menos parcial o completamente, una actividad biológica de una citocina trimérica. Según se usa en el presente documento, la expresión "neutraliza" o "neutralización" significa la inhibición de o la reducción de una actividad biológica de una citocina trimérica según se mide *in vivo* o *in vitro*.
- 15 En realizaciones útiles, el miembro de unión específico es un polipéptido derivado de un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral. Actualmente, se conocen al menos 29 receptores dentro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral y se enumeran a continuación en la tabla 2 junto con sus sinónimos y sus correspondientes ID de Genbank (GenBank, National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). La nomenclatura para los miembros de la superfamilia de receptores del TNF según se usa en el presente documento sigue la nomenclatura de la superfamilia del TNF (TNFSF) oficial que puede encontrarse en <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/tnftop.html>.
- 20

TABLA 2: Superfamilia de receptores del TNF

| Símbolo de receptor | ID de Genbank | Sinónimos |
|---------------------|---------------|---|
| TNFRSF1A | M75866 | p55-R, CD120a, TNF-R-I p55, TNF-R, TNFR1, TNFAR, TNF-R55, p55TNFR, TNFR60 |
| TNFRSF1B | M32315 | CD120b, p75, TNF-R, TNF-R-II, TNFR80, TNFR2, TNF-R75, TNFBR, p75TNFR |
| LTBR | L04270 | TNFRSF3, TNFR2-RP, CD18, TNFR-RP, TNFCR, TNF-R-III |
| TNFRSF4 | X75962 | OX40, ACT35, TXGP1L |
| TNFRSF5 | X60592 | p50, Bp50, CD40 |
| TNFRSF6 | M67454 | FAS, CD95, APO-1, APT1 |
| TNFRSF6B | AF104419 | DcR3, M68, TR6, HGNC:15888, NHL, DKFZP434CO13, KIAA1088, bK3184A7.3, C20orf41 |
| TNFRSF7 | M63928 | Tp55, S152, CD27 |
| TNFRSF8 | M83554 | Ki-1, D1S166E, CD30 |
| TNFRSF9 | L12964 | 4-1BB, CD137, ILA |
| TNFRSF10A | U90875 | DRA, Apo2, TRAILR-1 |
| TNFRSF10B | AF012628 | DR5, KILLER, TRICK2A, TRAIL-R2, TRICKB |
| TNFRSF10C | AF012536 | DcR1, TRAILR3, LIT, TRID |
| TNFRSF10D | AF029761 | DcR2, TRUNDD, TRAILR4 |
| TNFRSF11A | AF018253 | RANK |
| TNFRSF11B | U94332 | OPG, OCIF, TR1 |
| TNFRSF12 | U72763 | DR3, TRAMP, WSL-1, LARD, WSL-LR, DDR3, TR3, APO-3 |
| TNFRSF12L | - | DR3L |
| TNFRSF13B | AF023614 | TAC1 |

(cont.)

| Símbolo de receptor | ID de Genbank | Sinónimos |
|---------------------|---------------|-------------------------------|
| TNFRSF13C | AF373846 | BAFFR |
| TNFRSF14 | U70321 | HVEM, ATAR, TR2, LIGHTR, HVEA |
| NGFR | M14764 | TNFRSF16, p75NTR |
| TNFRSF17 | Z29574 | BCMA, TNFRSF13 |
| TNFRSF18 | AF125304 | AITR, GITR |
| TNFRSF19 | AB040434 | TAJ-alfa, TROY, TAJ, TRADE |
| TNFRSF19L | AF319553 | FLJ14993, RELT |
| TNFRSF21 | AF068868 | DR6 |
| TNFRSF22 | - | SOBa, Tnfrh2, 2810028K06Rik |
| TNFRSF23 | - | mSO6, Tnfrh1 |

- De ese modo, en realizaciones útiles el miembro de unión específico derivado de un receptor dentro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral se selecciona de los receptores TNFRSF1A, TNFRSF1B, LTBR, TNFRSF4, TNFRSF5, TNFRSF6, TNFRSF6B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFRSF12, TNFRSF12L, TNFRSF13B, TNFRSF13C, TNFRSF14, NGFR, TNFRSF17, TNFRSF18, TNFRSF19, TNFRSF19L, TNFRSF21, TNFRSF22 y TNFRSF23. Sin embargo, también se contempla que otros receptores útiles pueden identificarse dentro de esta familia de proteínas, y por tanto otros miembros de unión específica funcionales.
- 5 En una realización útil, el miembro de unión específico se deriva de los receptores de TNF TNFRSF1A (receptor TNFR1, p55) y/o TNFRSF1 B (receptor TNFR1, p75 TNF). Especialmente, se ha demostrado que el receptor TNFRSF1 B y las subunidades del mismo son eficaces para unirse de manera específica a y neutralizar TNF. Como ejemplo, la proteína de unión a TNF Eterncept es una proteína de fusión constituida por el dominio extracelular del receptor TNFRSF1 B, es decir una subunidad del receptor TNFRSF1B. Por consiguiente, en realizaciones específicas, el polipéptido trimérico según la invención incluye un miembro de unión específico que es una subunidad o fragmento del receptor TNFRSF1 B (TNFR1), tal como los fragmentos del receptor TNFRSF1 B dados a conocer en el documento US 5.712.155. De ese modo, en realizaciones útiles, el miembro de unión específico es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de TNFRSF1B 1-235 (SEC ID N.º:76), TNFRSF1B 1-185 (SEC ID N.º:77), TNFRSF1B 1-163 (SEC ID N.º:78) y TNFRSF1B 1-142 (SEC ID N.º:79).
- 10 En otras realizaciones útiles, según se da a conocer en los siguientes ejemplos, el miembro de unión específico puede ser uno o más fragmentos del receptor TNFRSF1 B (TNFR1) y combinaciones de tales fragmentos, tales como un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ADN seleccionada de TNFRSF1B D1D2 (SEC ID N.º:13), TNFRSF1B D1D2, 1/6 (SEC ID N.º:15), TNFRSF1B D1D2 1/4 (SEC ID N.º:17), TNFR1 D1D2, 1/3 (SEC ID N.º:19), TNFRSF1B D1D2, 1/2 (SEC ID N.º:21), TNFRSF1B D1 D4 (SEC ID N.º:23), TNFRSF1B D2 (SEC ID N.º:25), TNFRSF1B D2, 1/6 (SEC ID N.º:26), TNFRSF1B D2, 1/4 (SEC ID N.º:27), TNFRSF1B D2, 1/3 (SEC ID N.º:28), TNFRSF1B D2, 1/2 (SEC ID N.º:29) y TNFRSF1B D2D4 (SEC ID N.º:30).
- 15 Según la invención, el miembro de unión específico que puede unirse a una citocina trimérica puede ser también un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En el presente contexto, el término "anticuerpo" se usa para describir una inmunoglobulina ya sea natural o producida de manera parcial o completamente sintética. Ya que los anticuerpos pueden modificarse de diversos modos, el término "anticuerpo" debe interpretarse como que cubre cualquier miembro de unión específico o sustancia que tiene un dominio de unión con la especificidad por citocina trimérica requerida. De ese modo, este término cubre fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o completa o parcialmente sintética. Por tanto se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que tiene un dominio de unión que es, o es homólogo a, un dominio de unión a anticuerpo, por ejemplo simuladores de anticuerpo. Estos pueden derivarse de fuentes naturales, o pueden producirse de manera parcial o completamente sintética. Ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina y sus subclases isotípicas; fragmentos que comprenden un dominio de unión a antígeno tal como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40

El documento US 6.451.983 B2 describe anticuerpos para el factor de necrosis tumoral humano que, entre otras cosas, pueden neutralizar la actividad biológica de TNF. En particular, el documento US 6.451.983 B2 proporciona anticuerpos y fragmentos de los mismos que pueden unirse a TNF humano maduro (SEC ID N.º:80) dentro de ciertas regiones topográficas específicas. Por consiguiente, en realizaciones útiles de la presente invención, el miembro de unión específico es un anticuerpo o fragmento del mismo que puede unirse a TNF humano maduro (SEC ID N.º:80) en al menos una región seleccionada de las regiones que están constituidas por residuos de aminoácidos 1-18, 1-20, 1-26, 1-30, 12-22, 22-31, 22-40, 36-45, 49-97, 49-98, 56-79, 58-65, 69-97, 70-87, 76-90, 96-105, 105-128, 108-128, 110-127, 115-125, 117-128, 132-157, 135-155, 136-153, 138-149, 141-153 y 146-157.

El documento US 6.451.983 B2 proporciona además anticuerpos monoclonales específicos que pueden ser útiles en la presente invención. Por consiguiente, el miembro de unión específico que puede unirse a TNF humano puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo seleccionado de MAb 1 (ECACC 89080301), MAb 21 (ECACC 90012432), MAb 25 (ECACC 89121401), MAb 32 (ECACC 89080302), MAb 37 (ECACC 89080303), MAb 42 (ECACC 89080304), MAb 47 (ECACC 89121402), MAb 53 (ECACC 90012433) y MAb 54 (ECACC 89083103), en los que ECACC se refiere a la Colección Europea de Cultivos de Células Animales.

Ejemplos adicionales de anticuerpos útiles incluyen el anticuerpo D2E7 humanizado según se da a conocer en el documento US 6.090.382 y el fragmento de anticuerpo humanizado CDP 870 según se da a conocer en el documento WO/00194585.

En realizaciones específicas, los miembros de unión específica de la presente invención pueden comprender análogos de anticuerpo o anticuerpos artificiales tales como por ejemplo una proteína que tiene la estructura de armazón proteínico de dominios similar a lectina de tipo C (CTLD) según se da a conocer en el documento WO/0248189. Tal como será evidente a partir de los siguientes ejemplos, análogos de anticuerpos de CTLD basados en tetranectina humanos útiles que pueden unirse a TNF pueden seleccionarse de TN3-2-B (SEC ID N.º:103), TN3-2-C (SEC ID N.º:104) y TN3-2-D (SEC ID N.º:105).

Un aspecto importante de la presente invención es que los monómeros del polipéptido trimérico, además del miembro de unión específico, comprende además un dominio de trimerización. En el presente contexto, la expresión "dominio de trimerización" es un péptido, una proteína o parte de una proteína que puede interactuar con otros dominios de trimerización similares o idénticos. La interacción es del tipo que produce polipéptidos o proteínas triméricas. Una interacción de este tipo puede originarse mediante enlaces covalentes entre los componentes de los dominios de trimerización así como mediante fuerzas por puentes de hidrógeno, fuerzas hidrófobas, fuerzas de van der Waals y puentes salinos.

El dominio de trimerización se deriva de tetranectina, y puede comprender de manera más específica el elemento estructural de trimerización de tetranectina (denominado a continuación en el presente documento TTSE) que se describe en detalle en el documento WO 98/56906. La secuencia de aminoácidos de TTSE se muestra en SEC ID N.º:81. El efecto de trimerización de TTSE está provocado por una estructura de hélice enrollada que interactúa con la estructura de hélice enrollada de los otros dos TTSE para formar un trímero de triple hélice enrollada alfa helicoidal que es excepcionalmente estable incluso a temperaturas relativamente altas. El término TTSE pretende también abarcar variantes de un TTSE de un miembro que se produce de manera natural de la familia proteínas de tetranectina, variantes que se han modificado en la secuencia de aminoácidos sin afectar de manera adversa, hasta cualquier grado sustancial, a la capacidad del TTSE para formar trímeros de hélice enrollada alfa helicoidales. De ese modo, el polipéptido trimérico según la invención puede comprender un TTSE como dominio de trimerización, que comprende una secuencia que tiene al menos un 68% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de SEC ID N.º SEC ID N.º:81, tal como al menos un 75%, incluyendo al menos un 87%, tal como al menos un 92%. Según esto, el residuo de cisteína n.º 50 del TTSE (SEC ID N.º:81) puede estar mutado ventajosamente en serina, treonina, metionina o en cualquier otro residuo de aminoácido con el fin de evitar la formación de un puente disulfuro entre cadenas no deseado, que puede conducir a multimerización no deseada.

En otra realización, el dominio de trimerización de TTSE (SEC ID N.º:81) puede modificarse mediante (i) la incorporación de la secuencia de polihistidina y/o un sitio de escisión para el factor de coagulación sanguíneo X_a, (ii) sustitución de Cys 50 con Ser, e (iii) incluyendo una secuencia KGS C terminal.

Varios ejemplos de diferentes polipéptidos triméricos según la invención se proporcionan en los siguientes ejemplos, en los que se ha aplicado el dominio de trimerización de TTSE anterior. Estos incluyen entre otros las unidades de unión a TNF basadas en CTLD, TN-2-B (SEC ID N.º:106), TN-2-C (SEC ID N.º:108) y TN-2-D (SEC ID N.º:107), y el fragmento de TNFR_{II} humano trimerizado AD1 D4-GSS-110 (SEC ID N.º:109).

Según la invención, el miembro de unión específico puede unirse o bien al residuo de aminoácido N terminal o bien al C terminal del dominio de trimerización. Sin embargo, se prevé también que en ciertas realizaciones puede ser ventajoso enlazar un miembro de unión específico tanto al extremo N terminal como al extremo C terminal del dominio de trimerización del monómero, y por tanto proporcionar un polipéptido trimérico que comprende seis miembros de unión específica que puede unirse a una citocina trimérica.

Se apreciará que un ligador molecular flexible puede interponerse opcionalmente entre, y unirse covalentemente a,

el miembro de unión específico y el dominio de trimerización. En ciertas realizaciones, el ligador es una secuencia polipeptídica de aproximadamente 1-20 residuos de aminoácidos. El ligador puede ser inferior a 10 aminoácidos, lo más preferentemente, 5, 4, 3, 2 ó 1. Puede ser en ciertos casos que 9, 8, 7 ó 6 aminoácidos sean adecuados. En realizaciones útiles el ligador es esencialmente no inmunogénico, no es propenso a la escisión proteolítica y no comprende residuos de aminoácidos que se saben que interaccionan con otros residuos (por ejemplo residuos de cisteína).

El polipéptido trimérico de la presente invención puede expresarse en cualquier sistema de expresión de proteínas convencional adecuado cultivando un huésped transformado con un vector que codifica el polipéptido trimérico en condiciones tales que se expresa el polipéptido trimérico. Preferentemente, el sistema de expresión es un sistema a partir del cual la proteína deseada puede aislarse fácilmente y replegarse *in vitro*. Como cuestión general, se prefieren sistemas de expresión procariotas ya que pueden obtenerse altos rendimientos de proteínas y están disponibles estrategias eficaces de purificación y replegamiento. De ese modo, se encuentra bien dentro las capacidades y criterio del experto, sin experimentación excesiva, elegir un sistema de expresión apropiado o favorito. De manera similar, una vez que se elige la secuencia de aminoácidos primaria para el polipéptido trimérico de la presente invención, un experto en la técnica puede diseñar fácilmente constructos de ADN recombinantes apropiados que codificarán las proteínas deseadas, teniendo en consideración factores tales como que el codón influye en el huésped elegido, la necesidad de secreción de secuencias de señal en el huésped, la introducción de sitios de escisión de proteinasa dentro de la secuencia señal y similares. Estos constructos de ADN recombinantes pueden insertarse en marco en cualquiera de varios vectores de expresión apropiados para el huésped elegido. La elección de un vector de expresión apropiado o favorito es de nuevo una cuestión que se encuentra bien dentro de la capacidad y criterio del experto en la técnica. Preferentemente, el vector de expresión incluirá un promotor fuerte para dirigir la expresión de los constructos recombinantes. Finalmente, el polipéptido trimérico puede aislarse usando procedimientos convencionales adecuados bien conocidos en la técnica, y puede someterse opcionalmente a procesamiento adicional tal como por ejemplo liofilización.

El polipéptido trimérico según la invención puede usarse para la preparación de una composición farmacéutica mediante cualquier procedimiento adecuado bien conocido en la técnica. La composición puede comprender por lo tanto, junto con el polipéptido trimérico, uno o más vehículos aceptables, y opcionalmente otros componentes terapéuticos. Los vehículos deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros componentes y no nocivos para el receptor del mismo. En general, los procedimientos para la preparación de composiciones farmacéuticas incluyen la etapa de asociar el principio activo y un vehículo.

La aplicación terapéutica de la presente invención comprende el tratamiento de una enfermedad o un trastorno en un animal, mediante administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido trimérico según la invención a un animal que necesita del mismo. Según se mencionó anteriormente, se sabe que las citocinas triméricas, y en particular citocinas triméricas de la superfamilia de ligandos del TNF, son polipéptidos pleiotrópicos que actúan como moléculas de transducción de señales intercelulares, entre otras cosas, controlando y coordinando las respuestas inmunitarias e inflamatorias. De ese modo, se apreciará que el polipéptido trimérico de la presente invención puede aplicarse para el tratamiento de una amplia gama de trastornos y enfermedades mediados por citocinas triméricas, incluyendo enfermedades inflamatorias, trastornos autoinmunitarios, trastornos inmunitarios, infecciones, tumores malignos y enfermedades neurodegenerativas. En una realización útil, la enfermedad es una patología mediada por factor de necrosis tumoral, tal como artritis reumatoide, psoriasis y enfermedad de Crohn.

El polipéptido trimérico de la presente invención puede administrarse directamente al animal mediante cualquier técnica adecuada, incluyendo por vía parenteral, y puede administrarse local o sistémicamente. La ruta específica de administración depende, por ejemplo, del historial médico del animal. Los ejemplos de la administración parenteral incluyen administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial e intraperitoneal.

Los animales que pueden tratarse potencialmente mediante la proteína de fusión trimérica incluyen en el presente documento mamíferos tales como un ser humano.

Finalmente, la presente invención proporciona un procedimiento de ensayo para detectar una citocina polipeptídica trimérica en una muestra que comprende (i) poner en contacto la muestra con un polipéptido trimérico según la invención, y (ii) detectar la unión del polipéptido trimérico con la citocina trimérica.

La invención se describirá ahora a modo de ilustración en los siguientes ejemplos no limitativos y figuras.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la unión de una citocina trimérica dentro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral a un correspondiente receptor monomérico unido a la célula, que inicia el reclutamiento adicional de dos receptores de citocina más dando como resultado la formación de una unidad de señalización de citocina-receptor hexamérica.

La figura 2 muestra la unión de un agente de unión bivalente a una citocina trimérica dentro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF), que forma un complejo 1:1 con la citocina trimérica. Cuando el agente de unión bivalente se une a la citocina de TNFSF trimérica, sólo dos de tres posibles sitios de unión a receptor están ocupados por la molécula de agente de unión bivalente y el tercer sitio de unión a receptor se deja abierto. Esto

implica que el sitio de unión a receptor de citocina trimérica abierto puede asociarse con un receptor de citocina trimérica de superficie celular y de ese modo, debido a la alta concentración local de los receptores en la superficie celular, inicia el reclutamiento adicional de receptores triméricos y de ese modo la transducción de señal.

5 La figura 3 muestra un agente de unión para citocinas triméricas que puede formar un complejo 1:1 con una citocina trimérica y al mismo tiempo puede unirse de manera eficaz a los tres sitios de unión a receptor de la citocina trimérica, mediante lo cual ningún sitio de unión a receptor se deja abierto. El acoplamiento de la citocina a la superficie celular se bloquea y por tanto no se producirá ninguna transducción de señales.

10 La figura 4 muestra la inhibición de la citotoxicidad mediada por TNF alfa en un ensayo con la línea de células de fibroblastos murinas L929, a dos concentraciones diferentes fijadas de TNF alfa (1,0 ng/ml y 0,1 ng/ml) para el fragmento de receptor trimerizado D1D4GSSI10 Trip en diluciones de 10 veces.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Diseño y construcción de plásmidos de expresión de E. coli trip y fagemidos para la producción de agentes de unión a citocina trimérica

15 Fagemidos

El fagemido, psktripB, se construyó mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Not I sktripB amplificado a partir del plásmido de expresión pTtripb con los cebadores oligonucleotídicos C-sfikpn-TRI (SEC ID N.º:1) y N-sfikpn-TRI (SEC ID N.º:2) en un vector precortado con Sfi I y Not I, pCANTAB 5E suministrado por Amersham Pharmacia Biotech (n.º de código 27-9401-01) usando procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos de los insertos sktripB se proporciona como SEC ID N.º:3.

20 El fagemido, pskl10tripB, se construyó mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Not I skl10tripB amplificado a partir del plásmido de expresión pTtripb con los cebadores oligonucleotídicos C-sfikpn-TRI (SEC ID N.º:1) y N-sfikpn-110TRI (SEC ID N.º:4) en un vector precortado con Sfi I y Not I, pCANTAB 5E suministrado por Amersham Pharmacia Biotech (n.º de código 27-9401-01) usando procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos de los insertos skl10tripB se proporciona como SEC ID N.º: 5.

Plásmidos de expresión

30 El plásmido de expresión pT7H6-bktripB se construyó mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamHI y Hind I bktripB, amplificado a partir del plásmido de expresión pTtripb con los cebadores oligonucleotídicos C-bamkpn-TRI (SEC ID N.º:6) y N-bamkpn-TRI (SEC ID N.º: 7), en el plásmido de expresión restringido con BamH I y Hind I, pT7H6, usando procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos de bktripB se proporciona como SEC ID N.º:8.

35 El plásmido de expresión pT7H6-bkl10tripB se construyó mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Hind I bkl10tripB, amplificado a partir del plásmido de expresión pTtripb con los cebadores oligonucleotídicos C-bamkpn-TRI (SEC ID N.º: 6) y N-bamkpn-110TRI (SEC ID N.º:9), en el plásmido de expresión restringido con BamH I y Hind I, pT7H6, usando procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos de bkltripB se proporciona como SEC ID N.º:10.

Ejemplo 2

Diseño y construcción de un agente de unión a TNF trimérico usando fragmentos de TNFRII

40 Se usaron fragmentos y subunidades del receptor de TNF TNFRSF1B (TNFRII) para la construcción de agentes de unión a TNF triméricos basándose en el dominio de trimerización TripB derivado de tetranectina. El diseño y la clonación se esquematiza a continuación:

Clonación de fragmentos TNFRSF1B en vectores de fagemido

45 El vector de fagemido pD1 D2tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1D2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D1-rev (SEC ID N.º: 11) y D2kpn-fo (SEC ID N.º: 12)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D1D2, se proporciona como SEC ID N.º:13.

50 El vector de fagemido pD1 D2,1/6tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1D1/6 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D1-rev (SEC ID N.º: 11) D1/6kpn-fo (SEC ID N.º: 14)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D1D2,1/6, se proporciona como SEC ID

N.º:15.

- 5 El vector de fagemido pD1 D2,1/4tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1D1/4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D1-rev (SEC ID N.º: 11) y D1/4kpn-fo (SEC ID N.º: 16)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D1D2,1/4, se proporciona como SEC ID N.º:17.
- 10 El vector de fagemido pD1 D2,1/3tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1D1/3 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D1-rev (SEC ID N.º: 11) y D1/3kpn-fo (SEC ID N.º: 18)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D1D2,1/3, se proporciona como SEC ID N.º:19.
- 15 El vector de fagemido pD1 D2, 1/2tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1D1/2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D1-rev (SEC ID N.º: 11) y D1/2kpn-fo (SEC ID N.º: 20)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D1D2,1/2, se proporciona como SEC ID N.º:21.
- 20 El vector de fagemido pD1 D4tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1D4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D1-rev (SEC ID N.º: 11) y D4kpn-fo (SEC ID N.º: 22)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D1D4, se proporciona como SEC ID N.º:23.
- 25 El vector de fagemido pD1 D2110tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1D2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D1-rev (SEC ID N.º: 11) y D2kpn-fo (SEC ID N.º: 12)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D1D2, se proporciona como SEC ID N.º:13.
- 30 El vector de fagemido pD1D2, 1/6110tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1D1/6 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D1-rev (SEC ID N.º: 11) y D1/6kpn-fo (SEC ID N.º: 14)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D1D2, 1/6, se proporciona como SEC ID N.º:15.
- 35 El vector de fagemido pD1 D2,1/4110tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1D1/4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D1-rev (SEC ID N.º: 11) y D1/4kpn-fo (SEC ID N.º: 16)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D1D2,1/4, se proporciona como SEC ID N.º:17.
- 40 El vector de fagemido pD1D2,1/3110tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1D1/3 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D1-rev: (SEC ID N.º: 11) y D1/3kpn-fo (SEC ID N.º: 18)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D1D2,1/4, se proporciona como SEC ID N.º:19.
- 45 El vector de fagemido pD1 D2,1/2110tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1D1/2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D1-rev (SEC ID N.º: 11) y D1/2kpn-fo (SEC ID N.º: 20)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D1D2,1/2, se proporciona como SEC ID N.º:21.
- 50 El vector de fagemido pD1 D4110tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1D4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D1-rev (SEC ID N.º: 11) y D4kpn-fo (SEC ID N.º: 22)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psk110tripB, usando procedimientos

convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D1D4, se proporciona como SEC ID N.º:23.

5 El vector de fagemido pD2tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D2-rev (SEC ID N.º: 24) y D2kpn-fo (SEC ID N.º: 12)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D2, se proporciona como SEC ID N.º:25.

10 El vector de fagemido pD2,1/6tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1/6 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D2-rev (SEC ID N.º: 24) y D1/6kpn-fo (SEC ID N.º: 14)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psktripB, usando procedimientos convencionales, Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D2,1/6, se proporciona como SEC ID N.º:26.

15 El vector de fagemido pD2,1/4tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1/4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D2-rev (SEC ID N.º: 24) y D1/4kpn-fo (SEC ID N.º: 16)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D2,1/4, se proporciona como SEC ID N.º:27.

20 El vector de fagemido pD2,1/3tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1/3 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D2-rev (SEC ID N.º: 24) y D1/3kpn-fo (SEC ID N.º: 18)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D2,1/3, se proporciona como SEC ID N.º:28.

25 El vector de fagemido pD21/2tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1/2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D2-rev (SEC ID N.º: 24) y D1/2kpn-fo (SEC ID N.º: 20)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D2,1/2, se proporciona como SEC ID N.º:29.

30 El vector de fagemido pD2D4tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D2D4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D2-rev (SEC ID N.º: 24) y D4kpn-fo (SEC ID N.º: 22)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D2D4, se proporciona como SEC ID N.º:30.

35 El vector de fagemido pD2110tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D2-rev (SEC ID N.º: 24) y D2kpn-fo (SEC ID N.º: 12)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D2, se proporciona como SEC ID N.º:25.

40 El vector de fagemido pD2,1/6110tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1/6 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D2-rev (SEC ID N.º: 24) y D1/6kpn-fo (SEC ID N.º: 14)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D2,1/6, se proporciona como SEC ID N.º:26.

45 El vector de fagemido pD2,1/4110tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1/4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D2-rev (SEC ID N.º: 24) y D1/4kpn-fo (SEC ID N.º: 16)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D2,1/4, se proporciona como SEC ID N.º:27.

50 El vector de fagemido pD2,1/3110tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1/3 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D2-rev (SEC ID N.º: 24) y D1/3kpn-fo (SEC ID N.º: 18)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, psk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D2,1/3, se proporciona como SEC ID N.º:28.

El vector de fagemido pD2,1/2110tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D1/2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano

(Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D2-rev (SEC ID N.º: 24) y D1/2kpn-fo (SEC ID N.º: 20)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, pskl10tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D2.1/2, se proporciona como SEC ID N.º:29.

- 5 El vector de fagemido pD2D4I10tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I D2D4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos D2-rev (SEC ID N.º: 24) y D4kpn-fo (SEC ID N.º: 22)) en el vector cortado con Sfi I y Kpn I, pskl10tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de D2D4, se proporciona como SEC ID

10 N.º:30.

Clonación de fragmentos de receptor TNFRSF1B (TNFR1) en vectores de expresión

- 15 El vector de expresión pT7H6FXD1 D2tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1 D2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD1-rev (SEC ID N.º: 31) y D2kpn-fo (SEC ID N.º: 12)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD1 D2, se proporciona como SEC ID N.º:32.

- 20 El vector de expresión pT7H6FXD1D2,1/6tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1 D1/6 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD1-rev (SEC ID N.º: 31) y D1/6kpn-fo (SEC ID N.º: 14)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD1D2,1/6, se proporciona como SEC ID N.º:33.

- 25 El vector de expresión pT7H6FXD1 D2,1/4tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1 D1/4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD1-rev (SEC ID N.º: 31) y D1/4kpn-fo (SEC ID N.º: 16)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD1 D2,1/4, se proporciona como SEC ID N.º:34.

- 30 El vector de expresión pT7H6FXD1 D2,1/3tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1 D1/3 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD1-rev (SEC ID N.º: 31) y D1/3kpn-fo (SEC ID N.º: 18)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD1

35 D2,1/3, se proporciona como SEC ID N.º:35.

- 40 El vector de expresión pT7H6FXD1 D2,1/2tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1 D1/2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD1-rev (SEC ID N.º: 31) y D1/2kpn-fo (SEC ID N.º: 20)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD1 D2,1/2, se proporciona como SEC ID N.º:36.

- 45 El vector de expresión pT7H6FXD1 D4tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I FXD1 D4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD1-rev (SEC ID N.º: 31) y D4kpnfo (SEC ID N.º: 22)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6-bkl10tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD1 D4, se proporciona como SEC ID N.º:37.

- 50 El vector de expresión pT7H6FXD2tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD2-rev (SEC ID N.º: 38) y D2kpn-fo (SEC ID N.º: 12)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD2, se proporciona como SEC ID N.º:39.

- 55 El vector de expresión pT7H6FXD2,1/6tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1/6 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD2-rev (SEC ID N.º: 38) bamD2-rev (SEC ID N.º: 38) y D1/6kpn-fo (SEC ID N.º: 14)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de

FXD2,1/6, se proporciona como SEC ID N.º:40.

El vector de expresión pT7H6FXD2,1/4tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1D1/4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD2-rev (SEC ID N.º: 38) y D1/4kpn-fo (SEC ID N.º: 16)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD2,1/4, se proporciona como SEC ID N.º:41.

El vector de expresión pT7H6FXD2,1/3tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1D1/3 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD2-rev (SEC ID N.º: 38) y D1/3kpn-fo (SEC ID N.º: 18)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD2,1/3, se proporciona como SEC ID N.º:42.

El vector de expresión pT7H6FXD2,1/2tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1/2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD2-rev (SEC ID N.º: 38) y D1/2kpn-fo (SEC ID N.º: 20)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD2,1/2, se proporciona como SEC ID N.º:43.

El vector de expresión pT7H6FXD2D4tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I FXD2D4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD2-rev (SEC ID N.º: 38) y D4kpn-fo (SEC ID N.º: 22)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD2D4, se proporciona como SEC ID N.º:44.

El vector de expresión pT7H6FXD1D2I10tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1 D2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD1-rev (SEC ID N.º: 31) y D2kpn-fo (SEC ID N.º: 12)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bkI10tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD1 D2, se proporciona como SEC ID N.º:32.

El vector de expresión pT7H6FXD1 D2,1/6I10tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1 D1/6 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD1-rev (SEC ID N.º: 31) y D1/6kpn-fo (SEC ID N.º: 14)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bkI10tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD1D2,1/6, se proporciona como SEC ID N.º:33.

El vector de expresión pT7H6FXD1 D2,1/4I10tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1 D1/4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD1-rev (SEC ID N.º: 31) y D1/4kpn-fo (SEC ID N.º: 16)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bkI10tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD1 D2,1/4, se proporciona como SEC ID N.º:34.

El vector de expresión pT7H6FXD1 D2,1/13I10tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1 D1/3 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD1-rev (SEC ID N.º: 31) y D1/3kpn-fo (SEC ID N.º: 18)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6-bkI10tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD1 D2,1/3, se proporciona como SEC ID N.º:35.

El vector de expresión pT7H6FXD1 D2,1/2I10tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1 D1/2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD1-rev (SEC ID N.º: 31) y D1/2kpn-fo (SEC ID N.º: 20)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6-bkI10tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD1D2,1/2, se proporciona como SEC ID N.º:36.

El vector de expresión pT7H6FXD1 D4I10tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I FXD1 D4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD1-rev

(SEC ID N.º: 31) y D4kpn-fo (SEC ID N.º: 22)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6-bk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD1 D4, se proporciona como SEC ID N.º:37.

5 El vector de expresión pT7H6FXD2I1 OtripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD2-rev (SEC ID N.º: 38) y D2kpn-fo (SEC ID N.º: 12)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD2, se proporciona como SEC ID N.º:39.

10 El vector de expresión pT7H6FXD2,1/6I10tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1/6 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD2-rev (SEC ID N.º: 38) y D1/6kpn-fo (SEC ID N.º: 14)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD2,1/6, se proporciona como SEC ID N.º:40.

15 El vector de expresión pT7H6FXD2,1/4I10tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1 D1/4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD2-rev (SEC ID N.º: 38) y D1/4kpn-fo (SEC ID N.º: 16)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD2,1/4, se proporciona como SEC ID N.º:41.

20 El vector de expresión pT7H6FXD2,1/3I10tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1 D1/3 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD2-rev (SEC ID N.º: 38) y D1/3kpn-fo (SEC ID N.º: 18)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6-bk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD2,1/3, se proporciona como SEC ID N.º:42.

25 El vector de expresión pT7H6FXD2,1/2I10tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXD1/2 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD2-rev (SEC ID N.º: 38) y D1/2kpn-fo (SEC ID N.º: 20)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6-bk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD2,1/2, se proporciona como SEC ID N.º:43.

30 El vector de expresión pT7H6FXD2D4I10tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Sfi I y Kpn I FXD2D4 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamD2-rev (SEC ID N.º: 38) y D4kpn-fo (SEC ID N.º: 22)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6-bk110tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXD2D4, se proporciona como SEC ID N.º:44.

35 El vector de expresión pT7AD1 D4-I162-tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I AD1 D4-I162 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos pBamHI-A5 (SEC ID N.º:82) y pKpnI-I162 (SEC ID N.º:83) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante AD1 D4-I162-tripB, se proporciona como SEC ID N.º:84.

40 El vector de expresión pT7AD1 D4-GSS-tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I AD1 D4-GSS amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos pBamHI-A5 (SEC ID N.º:82) y pKpnI-GSS (SEC ID N.º:85) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante AD1 D4-GSS-tripB, se proporciona como SEC ID N.º:86.

45 El vector de expresión pT7AD1 D4-D235-tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I AD1 D4-D235 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos pBamHI-A5 (SEC ID N.º:82) y pKpnI-D235 (SEC ID N.º:87) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante AD1 D4-D235-tripB, se proporciona como SEC ID N.º:88.

50 El vector de expresión pT7AD1D4-I162-I10-tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido

con BamH I y Kpn I AD1 D4-I162 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos pBamHI-A5 (SEC ID N.º:82) y pKpnI-I162 (SEC ID N.º:83) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7-bkl10tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante AD1D4-I162-I10-tripB, se proporciona como SEC ID N.º:89.

El vector de expresión pT7AD1D4-GSS-I10-tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I AD1 D4-GSS amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos pBamHI-A5 (SEC ID N.º:83) y pKpnI-GSS (SEC ID N.º:85) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7-bkl10tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante AD1D4-GSS-I10-tripB se proporciona como SEC ID N.º:90.

El vector de expresión pT7AD1 D4-D235-I10-tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I AD1 D4-D235 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos pBamHI-A5 (SEC ID N.º:83) y pKpnI-D235 (SEC ID N.º:87) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7-bkl10tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante AD1D4-D235-I10-tripB, se proporciona como SEC ID N.º:91.

El vector de expresión pT7AD1D4-GSS-V17-tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Kpn I y Hind III V17-TripB amplificado a partir de ADNc (con los cebadores oligonucleotídicos pKpnI-V17 (SEC ID N.º:92) y pBAD6H (SEC ID N.º:93) en un vector cortado con Kpn I y Hind III, pT7AD1 D4-GSS-tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante AD1 D4-GSS-V17-tripB, se proporciona como SEC ID N.º:94.

El vector de expresión pT7AD1D4-D235-V17-tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Kpn I y Hind III V17-TripB amplificado a partir de ADNc (con los cebadores oligonucleotídicos pKpnI-V17 (SEC ID N.º:92) y pBAD6H (SEC ID N.º:93) en un vector cortado con Kpn I y Hind III, pT7AD1D4-D235-tripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante AD1 D4-D235-V17-tripB, se proporciona como SEC ID N.º:95.

Ejemplo 3

Producción, replegamiento y purificación del fragmento de TNFRII trimerizado AD1D4-GSS-I10-TripB

La construcción del plásmido de expresión dependiente de la ARN polimerasa T7, pT7D1 D4GSSI10 (que expresa el derivado de TNFRII AD1 D4-GSS-I10-TripB) se describe anteriormente en el ejemplo 2.

Se produjo el fragmento de TNFRII humano trimerizado AD1 D4-GSS-I10 (SEC ID N.º:109) haciendo crecer y expresando el plásmido pT7AD1 D4-GSS-110 en células BL21 de *E. coli* en una escala media (6 x 1 litro) según se describe por Studier y Moffat, *J. Mol. Biol.*, 189: 113-130, 1986. Brevemente, se infectaron a DO600 0,8 cultivos de crecimiento exponencial a 37°C con bacteriófago λ -CE6 a una multiplicidad de aproximadamente 5. Se hicieron crecer cultivos a 37°C durante otras tres horas antes de que se recogieran las células mediante centrifugación. Se lisaron las células mediante choque osmótico y sonicación y se extrajo la proteína celular total en fenol (ajustado a pH 8 con base Trisma). Se hizo precipitar la proteína desde la fase de fenol mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol y centrifugación. Se disolvió el sedimento de proteína en un tampón que contenía cloruro de guanidinio 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8 y ditioeritriol 50 mM. Tras la filtración en gel en Sephadex G-25 (Amersham Biosciences) en urea 8 M, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM pH 8, y 2-mercaptoetanol 5 mM se aplicó la preparación de proteínas bruta a columnas de NTA-agarosa (Qiagen, Alemania) activada con Ni²⁺ para la purificación (Hochuli *et al.*, 1988) de las proteínas de fusión y, mientras estaban inmovilizadas en la columna, para someterlas al procedimiento de plegamiento cíclico según se describió anteriormente en el documento WO 94/18227.

Se desgasificaron todos los tampones preparados para la cromatografía de líquidos a vacío antes de la adición del agente reductor y/o su uso.

Tras la aplicación de los extractos de proteína brutos en la columna de Ni²⁺NTA-agarosa, se purificó la proteína de fusión, AD1D4-GSS-I10, de la mayoría de proteínas de coli y fago λ mediante lavado con un volumen de columna del tampón de carga seguido de cloruro de guanidinio 6 M, Tris-HCl 50 mM y 2-mercaptoetanol 5 mM hasta que la densidad óptica (DO) a 280 nm del eluido de la columna era estable.

Se replegaron las proteínas de fusión en la columna de Ni²⁺NTA-agarosa usando un perfil de control de gradiente según se describe en la tabla 1 y NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM pH 8 y glutatión reducido/oxidado 2 mM/0,2 mM como tampón A y urea 8 M, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM pH 8 y glutatión reducido 3 mM como tampón B.

Tras completar el procedimiento de plegamiento cíclico se eluyó la proteína de fusión AD1 D4-GSS-I10 de las columnas de Ni²⁺NTA-agarosa con un tampón que contenía urea 8 M, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM y EDTA 10 mM pH 8.

Se purificaron las proteínas de fusión AD1 D4-GSS-I10 monoméricas de dímeros y multímeros de orden superior mediante cromatografía de intercambio iónico en S- y Q-Sepharose (Amersham Biosciences): se filtró en gel la proteína de fusión, eluida mediante el tampón de elución (aproximadamente un 80 % del material de proteínas de fusión), en un tampón que contenía urea 8 M, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y NaCl 25 mM en Sephadex G-25 y se aplicó en la columna de intercambio iónico S-Sepharose. La proteína no unida en las fracciones “que atraviesan” se cargaron directamente en la columna Q-Sepharose. Se eluyeron proteínas de fusión AD1 D4-GSS-I10 monoméricas desde la columna Q-Sepharose con un gradiente lineal desde urea 8 M, NaCl 25 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8 hasta urea 8 M, NaCl 300 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8 con respecto a volúmenes de 10 columnas. La proteína de fusión AD1D4-GSS-I10 monomérica eluyó al comienzo del gradiente, mientras que dímeros y multímeros de orden superior eluyeron más tarde. Se renaturalizaron fracciones que contenían la proteína de fusión monomérica y se trimerizaron mediante filtración en gel en un tampón que contenía HEPES 10 mM pH 7,4 y NaCl 125 mM.

TABLA 3: Perfil de control de gradiente de tampón

| Etapa | Tiempo (min.) | Flujo (ml/min.) | Bomba A (%) | Bomba B (%) |
|-------|---------------|-----------------|-------------|-------------|
| 1 | 0,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 2 | 45,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 3 | 46,0 | 2,00 | 0,0 | 100,0 |
| 4 | 52,0 | 2,00 | 0,0 | 100,0 |
| 5 | 60,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 6 | 105,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 7 | 106,0 | 2,00 | 4,0 | 96,0 |
| 8 | 113,0 | 2,00 | 4,0 | 96,0 |
| 9 | 120,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 10 | 165,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 11 | 166,0 | 2,00 | 6,0 | 94,0 |
| 12 | 172,0 | 2,00 | 6,0 | 94,0 |
| 13 | 180,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 14 | 225,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 15 | 226,0 | 2,00 | 8,0 | 92,0 |
| 16 | 232,0 | 2,00 | 8,0 | 92,0 |
| 17 | 240,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 18 | 285,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 19 | 286,0 | 2,00 | 10,0 | 90,0 |
| 20 | 292,0 | 2,00 | 10,0 | 90,0 |
| 21 | 300,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 22 | 345,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 23 | 346,0 | 2,00 | 12,0 | 88,0 |
| 24 | 352,0 | 2,00 | 12,0 | 88,0 |
| 25 | 360,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 26 | 405,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 27 | 406,0 | 2,00 | 14,0 | 86,0 |

ES 2 367 749 T3

(cont.)

| Etapa | Tiempo (min.) | Flujo (ml/min.) | Bomba A (%) | Bomba B (%) |
|-------|---------------|-----------------|-------------|-------------|
| 28 | 412,0 | 2,00 | 14,0 | 86,0 |
| 29 | 420,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 30 | 465,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 31 | 466,0 | 2,00 | 16,0 | 84,0 |
| 32 | 472,0 | 2,00 | 16,0 | 84,0 |
| 33 | 480,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 34 | 525,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 35 | 526,0 | 2,00 | 18,0 | 82,0 |
| 36 | 532,0 | 2,00 | 18,0 | 82,0 |
| 37 | 540,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 38 | 585,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 39 | 586,0 | 2,00 | 20,0 | 80,0 |
| 40 | 592,0 | 2,00 | 20,0 | 80,0 |
| 41 | 600,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 42 | 645,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 43 | 646,0 | 2,00 | 22,0 | 78,0 |
| 44 | 652,0 | 2,00 | 22,0 | 78,0 |
| 45 | 660,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 46 | 705,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 47 | 706,0 | 2,00 | 24,0 | 76,0 |
| 48 | 713,0 | 2,00 | 24,0 | 76,0 |
| 49 | 720,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 50 | 765,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 51 | 766,0 | 2,00 | 25,0 | 75,0 |
| 52 | 772,0 | 2,00 | 25,0 | 75,0 |
| 53 | 780,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 54 | 825,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 55 | 826,0 | 2,00 | 25,0 | 75,0 |
| 56 | 832,0 | 2,00 | 25,0 | 75,0 |
| 57 | 840,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 58 | 885,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 59 | 886,0 | 2,00 | 25,0 | 75,0 |
| 60 | 892,0 | 2,00 | 25,0 | 75,0 |

ES 2 367 749 T3

(cont.)

| Etapa | Tiempo (min.) | Flujo (ml/min.) | Bomba A (%) | Bomba B (%) |
|-------|---------------|-----------------|-------------|-------------|
| 61 | 900,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 62 | 945,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 63 | 946,0 | 2,00 | 25,0 | 75,0 |
| 64 | 952,0 | 2,00 | 25,0 | 75,0 |
| 65 | 960,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 66 | 1005,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 67 | 1006,0 | 2,00 | 30,0 | 70,0 |
| 68 | 1012,0 | 2,00 | 30,0 | 70,0 |
| 69 | 1020,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 70 | 1065,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 71 | 1066,0 | 2,00 | 30,0 | 70,0 |
| 72 | 1072,0 | 2,00 | 30,0 | 70,0 |
| 73 | 1080,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 74 | 1125,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 75 | 1126,0 | 2,00 | 35,0 | 65,0 |
| 76 | 1132,0 | 2,00 | 35,0 | 65,0 |
| 77 | 1140,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 78 | 1185,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 79 | 1186,0 | 2,00 | 40,0 | 60,0 |
| 80 | 1192,0 | 2,00 | 40,0 | 60,0 |
| 81 | 1200,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 82 | 1245,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 83 | 1246,0 | 2,00 | 50,0 | 50,0 |
| 84 | 1252,0 | 2,00 | 50,0 | 50,0 |
| 85 | 1260,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 86 | 1305,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 87 | 1306,0 | 2,00 | 60,0 | 40,0 |
| 88 | 1312,0 | 2,00 | 60,0 | 40,0 |
| 89 | 1319,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 90 | 1364,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 91 | 1365,0 | 2,00 | 60,0 | 40,0 |
| 92 | 1371,0 | 2,00 | 60,0 | 40,0 |
| 93 | 1378,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |
| 94 | 1423,0 | 2,00 | 100,0 | 0,0 |

Ejemplo 4**Actividad biológica del fragmento de TNFRII trimerizado AD1D4-GSS-I10**

Se midió la actividad biológica del fragmento de TNFRII trimerizado AD1D4-GSS-I10 (producido según se describió en el ejemplo 3) en un ensayo de células L929 para determinar la inhibición de la citotoxicidad mediada por TNF alfa.

La línea de células de fibroblastos murinos L929 (ECACC n.º: 85011425) se usó para medir la citotoxicidad mediada por TNF alfa. Se mantuvieron las células en medio líquido RPMI 1640 (Biowhittaker, R.U.) complementado con FBS al 10% y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml). Se colocaron en placas las células en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (NUNC, Roskilde, Dinamarca) a 3×10^5 células/ml y 75 µl/pocillo de medio RPMI 1640 completo y se cultivaron durante la noche a 37°C en CO₂ al 5%. Se incubó TNF alfa humano recombinante (rhTNFa, RD Systems, R.U.) (1 ng/ml y 0,1 ng/ml) con diversas concentraciones (diluciones de 10 veces) del fragmento de receptor trimerizado (AD1D4-GSS-I10) en medio RPMI 1640 completo complementado con 2 µg/ml de actinomicina D (Sigma) durante 1 h a 37°C en CO₂ al 5%. A continuación, se añadieron 75 µl/pocillo de las mezclas TNF-alfa/fragmento de receptor trimerizado al cultivo celular para la incubación durante la noche a 37°C en CO₂ al 5%. Se sometió a prueba por triplicado cada concentración de la mezcla TNF-alfa/fragmento de receptor. Se determinó la proliferación celular usando MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-di-fenil-tetrazolio) como parte del kit de ensayo de la proliferación celular no radiactivo CellTiter 96 (Promega). Para la preparación de reactivos suficientes para una placa de 96 pocillos que contiene células cultivadas en un volumen de 150 µl, se añadieron 3,0 ml de disolución de MTS a 150 µl de PMS. Se añadieron 30 µl/pocillo de la disolución de MTS/PMS combinada y se incubaron las placas durante 1-4 h a 37°C en CO₂ al 5% antes de registrar la absorbancia a 492 nm usando un lector de placas ELISA. Se incluyeron también en cada ensayo controles de TNF alfa con las células, células solas y control de tampón.

El resultado del experimento se resume en la figura 4. El efecto citotóxico de TNF alfa se inhibió significativamente en presencia de la concentración máxima de AD1 D4-GSS-110 demostrando de ese modo la actividad biológica del compuesto.

Ejemplo 5**Diseño, construcción y producción de un agente de unión a TNF trimérico usando fragmentos de anticuerpo D2E7.**

Se selecciona como agente de unión fragmentos de región variable de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) del anticuerpo humanizado D2E7 en la construcción de un polipéptido trimérico que puede unirse a TNF. El agente de unión trimérico puede construirse amplificando los dominios VH y VL de D2E7, basándose en la secuencia dada a conocer en el documento US 6.090.382.

Diseño y construcción de scFv de D2E7 trimérico con un ligador de Gly, Thr entre scFv N terminal y dominio de trimerización C terminal

El vector de expresión pT7H6FXD2E7tripB se construye en dos etapas. La primera etapa es la construcción de pT7H6FX (D2E7VH)tripB. Este vector se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Bgl II y Kpn I FX (D7E2VH) amplificado a partir de ADN que contiene la secuencia de D2E7 (con los cebadores oligonucleotídicos FXVH (SEC ID N.º: 45) y VHBamKpn (SEC ID N.º: 46)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6bktripB. La segunda etapa es la construcción de pT7H6FXD2E7tripB mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I G4SVL amplificado a partir de ADN que contiene la secuencia de D2E7 (con los cebadores oligonucleotídicos G4SVL (SEC ID N.º: 47) y VLkpn (SEC ID N.º: 48)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6FX(D2E7VH)tripB. La secuencia de nucleótidos de FXD2E7, se proporciona como SEC ID N.º:49.

Diseño y construcción de scFv de D2E7 trimérico con un ligador de Gly, Gly, Gly, Ser, Gly, Thr entre scFv N terminal y dominio de trimerización C terminal

El vector de expresión pT7H6FXD2E7G4StripB se construye en dos etapas. La primera etapa es la construcción de pT7H6FX(D2E7VH)tripB mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Bgl II y Kpn I FX(D7E2VH) amplificado a partir de ADN que contiene la secuencia de D2E7 (con los cebadores oligonucleotídicos FXVH (SEC ID N.º: 45) y VHBamKpn (SEC ID N.º: 46)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6bktripB. La segunda etapa es la construcción de pT7H6FXD2E7tripB mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I G4SVL amplificado a partir de ADN que contiene la secuencia de D2E7 (con los cebadores oligonucleotídicos G4SVL (SEC ID N.º: 47) y VLG4Skpn (SEC ID N.º: 50)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6FX(D2E7VH)tripB. La secuencia de nucleótidos resultante de FXD2E7G4S, se proporciona como SEC ID N.º:51.

Diseño y construcción de scFv de D2E7 trimérico con ligador de Gly, Ser entre el dominio de trimerización N terminal y el scFv C terminal

El vector de expresión pT76HFXTripAGSD2E7 se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Bcl I y Hind III, amplificado a partir de pT7H6FXD2E7G4StripB (con los cebadores oligonucleotídicos bclIVH (SEC ID N.º:52) y VLhind (SEC ID: 53)) en un vector cortado con BamH I y Hind III, pT76HFXTripa (Lorentsen, RH. *et al*, Biochem J.;347:83-87, 2000) usando procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos resultante de GSD2E7, se proporciona como SEC ID N.º:54.

Diseño y construcción de scFv de D2E7 trimérico con ligador de Gly, Ser, Gly, Gly, Gly, Ser entre el dominio de trimerización N terminal y el scFv C terminal

El vector de expresión pT76HFXTripAG4SD2E7 se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Bcl I y Hind III, amplificado a partir de pT7H6FXD2E7G4StripB (con los cebadores oligonucleotídicos bclG4SVH (SEC ID N.º:55) y VLhind (SEC ID: 53)) en un vector cortado con BamH I y Hind III, pT76HFXTripa (Lorentsen, RH. *et al*, Biochem J.;347: 83-87, 2000) usando procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos resultante de G4SD2E7, se proporciona como SEC ID N.º:56.

Para preparar las proteínas de fusión anteriores H6FXD2E7tripB, H6FXD2E7G4StripB, H6FXTripAD2D7TripA y H6FxTripAG4SD2E7, se hacen crecer los plásmidos pT7H6FXD2E7tripB, pT7H6FXD2E7G4StripB, pT7H6FXTripAD2D7TripA y pT7H6FxTripAG4SD2E7 a escala pequeña (1 litro; 2x medio TY, MgSO₄ 5 mM y 100 µg de ampicilina) en células BL21 de *E. coli*, según se describe por Studier *et al.* (1990). Se infectan a DE600 0,8 cultivos de crecimiento exponencial a 37°C con bacteriófago lambda CE6 a una multiplicidad de aproximadamente 5. Se hacen crecer los cultivos a 37°C durante otras tres horas y las células se recogen mediante centrifugación. Se resuspenden las células en 50 ml de NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8. Se añadió fenol (50 ml ajustado a pH 8) a cada una y las mezclas se someten a sonicación para extraer la proteína total. Tras la clarificación mediante centrifugación (25 minutos a 10,000 g) se hacen precipitar las fracciones de proteína bruta desde las fases de fenol mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol y centrifugación. Se disuelven los sedimentos de proteínas en un tampón (15-25 ml) que contiene cloruro de guanidinio 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8 y ditioeritriol 0,1 M. Tras la filtración en gel en Sephadex G-25 (Pharmacia, Suecia) en urea 8 M, NaCl 1 M, Tris-HCl 50 mM pH 8 y 2-mercaptoetanol 10 mM, se aplican las preparaciones de proteína bruta a columnas de NTA-agarosa activada con Ni (volumen de columna de 75 ml) para la purificación (Hochuli *et al.*, 1988). Entonces se hace fluir el tampón de lavado (HCl de guanidina 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8 y 2-mercaptoetanol 10 mM) a través de las columnas hasta que se obtienen niveles iniciales estables.

Entonces se eluyen las proteínas de fusión prácticamente puras aplicando un gradiente de pH a cada columna (1000 ml de gradiente in urea 8 M y 2-mercaptoetanol 10 mM obtenido mediante mezclado lineal (por volumen) de disoluciones que contienen dihidrogenofosfato de sodio 50 mM (tampón de pH 5) y hidrogenofosfato de disodio 50 mM (tampón de pH 8).

En la preparación para el replegamiento *in vitro* mediante el procedimiento de Thøgersen *et al.* (documento WO 94/18227) se mezclan 20 mg de cada proteína de fusión purificada en suspensiones en "tampón B" de replegamiento (descrito a continuación) con alícuotas de suspensiones de matriz de NTA-agarosa activada con Ni²⁺ suficientes para generar columnas de aproximadamente 75 ml de volumen de lecho empacado. Cada proteína de fusión se somete entonces al procedimiento de replegamiento iterativo según se describe para el plasminógeno kringle 4 en el documento WO 94/18227, excepto que el replegamiento de las proteínas de fusión que contienen scFv se lleva a cabo a 10°C usando un tampón que contiene NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM pH 8, glutatión 2 mM y glutatión oxidado 0,2 mM como "tampón A" y un tampón que contiene urea 8 M, NaCl 1 M, Tris-HCl 50 mM pH 8 y glutatión 2 mM como "tampón B".

Tras completar el procedimiento de replegamiento se lava cada columna con 300 ml de tampón que contiene NaCl 0,5 M y Tris-HCl 50 mM pH 8 para separar por lavado el glutatión. La fracción replegada de cada proteína se eluye entonces desde la NTA-agarosa en EDTA 20 mM, NaCl 0,5 M y Tris-HCl 50 mM pH 8 hasta el tampón de elución. Tras la adición de urea sólida para alcanzar una concentración final de aproximadamente 8 M para cada muestra de proteínas y la dilución o diálisis para reducir las concentraciones de NaCl hasta por debajo de 5 mM, se realiza entonces la purificación final de cada producto de proteína de fusión plegada correctamente mediante cromatografía de intercambio iónico (S-Sepharose, Pharmacia, columna de 1,6 (diámetro interno) por 90 centímetros en un tampón que contiene urea 8 M, Tris-HCl 5 mM (de una disolución de reserva 1 M a pH 8) y acetato de sodio 25 mM (de una disolución de reserva 1 M a pH 5), eluida a 2 ml/min.). Tras diálisis frente a tampones acuosos (por ejemplo solución salina tamponada con fosfato) cada proteína de fusión pura y plegada correctamente se recupera en rendimientos de 2-6 mg por litro de cultivo que se ha hecho crecer.

Ejemplo 6

Diseño y construcción de un agente de unión a APRIL trimérico usando fragmentos de receptor TNFRSF13B

El receptor de APRIL, TNFRSF13B, se usa para la construcción de agentes de unión triméricos frente a la citocina trimérica APRIL, y basándose en el dominio de trimerización TripB derivado de tetranectina. El diseño y la clonación de tales agentes de unión con diferentes ligadores se esquematiza a continuación:

Clonación de TNFRSF13B6

El vector de expresión pT7H6FXTNFRSF13B6tripB se construye en dos etapas. La primera etapa es construir pT7H6FX?TNFSF13B mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Bgl II y Kpn I FX?TNFRSF13B amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bgliiFX?TNFRSF13B (SEC ID N.º: 57) y ?TNFRSF13Bkpn: (SEC ID N.º: 58)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, pT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. La segunda etapa es construir el vector de expresión final pT7H6FXTNFRSF13B6tripB mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Kpn I, ?TNFRSF13B6 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos kpn?TNFSF13B (SEC ID N.º: 59) y ?TNFSF13B6kpn (SEC ID N.º: 60)) en un vector cortado con Kpn I, pT7H6FX?TNFSF13B, usando procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos resultante de FXTNFRSF13B6, se proporciona como SEC ID N.º:61.

Clonación de TNFRSF13B10

El vector de expresión pT7H6FXTNFRSF13B10tripB se construye en dos etapas. La primera etapa es construir pT7H6FX?TNFRSF13B mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Bgl II y Kpn I FX?TNFRSF13B amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bgliiFX?TNFRSF13B (SEC ID N.º: 57) y ?TNFRSF13Bkpn (SEC ID N.º: 58)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. La segunda etapa es construir el vector de expresión final pT7H6FXTNFRSF13B10tripB mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Kpn I, ?TNFSF13B10 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos kpn?TNFSF13B (SEC ID N.º: 59) y ?TNFSF13B10kpn (SEC ID N.º: 62)) en un vector cortado con Kpn I, pT7H6FX?TNFRSF13B, usando procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos resultante de FXTNFRSF13B10, se proporciona como SEC ID N.º: 63.

Clonación de TNFRSF13B20

El vector de expresión pT7H6FXTNFRSF13B20tripB se construye en dos etapas. La primera etapa es construir pT7H6FX?TNFRSF13B mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Bgl II y Kpn I FX?TNFSF13B amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bgliiFX?TNFRSF13B (SEC ID N.º: 57) y ?TNFRSF13Bkpn (SEC ID N.º: 58)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bktripB usando procedimientos convencionales. La segunda etapa es construir el vector de expresión final pT7H6FXTNFRSF13B20tripB mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Kpn I, ?TNFSF13B20 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos kpn?TNFRSF13B (SEC ID N.º: 59) y ?TNFRSF13B20kpn (SEC ID N.º: 64)) en un vector cortado con Kpn I, pT7H6FX?TNFRSF13B, usando procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos resultante de FXTNFRSF13B20, se proporciona como SEC ID N.º:65.

Clonación de TNFRSF13B30

El vector de expresión pT7H6FXTNFRSF13B30tripB se construye en dos etapas. La primera etapa es construir pT7H6FX?TNFRSF13B mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Bgl II y Kpn I, FX?TNFRSF13B amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bgliiFX?TNFRSF13B (SEC ID N.º: 57) y ?TNFRSF13Bkpn (SEC ID N.º: 58)) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. La segunda etapa es construir el vector de expresión final pT7H6FXTNFRSF13B30tripB mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Kpn I, TNFRSF13B30 amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos kpn?TNFRSF13B (SEC ID N.º: 59) y ?TNFRSF13B30kpn (SEC ID N.º: 66)) en un vector cortado con Kpn I, pT7H6FX?TNFRSF13B, usando procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos resultante de FXTNFRSF13B30, se proporciona como SEC ID N.º:67.

Clonación de TNFRSF13B61

El vector de expresión pT7H6FXTNFRSF13B61tripB se construye en dos etapas. La primera etapa es construir pT7H6FX?TNFRSF13B mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Bgl II y Kpn I, FX?TNFRSF13B amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bgliiFX?TNFRSF13B (SEC ID N.º: 57) y ?TNFRSF13Bkpn (SEC ID N.º: 58)) en un vector cortado con BamHI y Kpn I, PT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. La segunda etapa es construir el vector de expresión final pT7H6FXTNFRSF13B61tripB mediante ligación del fragmento de ADN restringido con Kpn I, TNFRSF13B61

amplificado a partir de ADNc, aislado de una mezcla de médula ósea humana y leucocito humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7181-1 y 7182-1) (con los cebadores oligonucleotídicos kpn?TNFRSF13B (SEC ID N.º: 59) y ?TNFRSF13B61kpn (SEC ID N.º: 68)) en un vector cortado con Kpn I, pT7H6FX?TNFRSF13B, usando procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos resultante de FXTNFRSF13B61, se proporciona como SEC ID N.º:69.

Ejemplo 7

Diseño y construcción de un agente de unión a TWEAK trimérico usando fragmentos de receptor TNFRSF Fn14

El receptor de TWEAK, TNFRSF Fn14, se usa para la construcción de un agente de unión trimérico frente a la citocina trimérica TWEAK, y basándose en el dominio de trimerización TripB derivado de tetranectina. El diseño y la clonación del agente de unión se esquematiza a continuación:

El vector de expresión pT7H6FXFn14tripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I FXFn14 amplificado a partir de ADNc, aislado de corazón humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7121-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bamFn-rev (SEC ID N.º: 70) y FNkpn-fo (SEC ID N.º:71) en un vector cortado con BamH I y Kpn I, PT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXFn14, se proporciona como SEC ID N.º:72.

Ejemplo 8

Diseño y construcción de un agente de unión a BAFF trimérico usando fragmentos de receptor TNFRSF13C

El receptor de BAFF, TNFRSF13B, se usa para la construcción de un agente de unión trimérico frente a la correspondiente citocina trimérica BAFF, y basándose en el dominio de trimerización TripB derivado de tetranectina. El diseño y la clonación del agente de unión se esquematiza a continuación:

Clonación del fragmento TNFRSF13C trimérico

El vector de expresión pT7H6FXTNFSF13CtripB se construye mediante ligación del fragmento de ADN restringido con BamH I y Kpn I, FXTNFRSF13C amplificado a partir de ADNc, aislado de ganglio linfático humano (Clontech Laboratories, Inc n.º de cat. 7164-1) (con los cebadores oligonucleotídicos bam13C-rev (SEC ID N.º: 73) y 13Ckpn-fo (SEC ID N.º:74) en un vector cortado con BamHI y Kpn I, PT7H6-bktripB, usando procedimientos convencionales. Un esquema de la secuencia de nucleótidos resultante de FXTNFRSF13C, se proporciona como SEC ID N.º:75.

Ejemplo 9

Aislamiento y construcción de agentes de unión a CTLD trimerizados para TNF

La estructura de armazón proteínico de dominios similar a lectina de tipo C (CTLD) de tetranectina (SEC ID N.º:96), según se dio a conocer anteriormente en el documento WO/0248189, se usó para el aislamiento y la construcción de una unidad de unión trimérica para la citocina trimérica TNF (TNF alfa). El diseño y la clonación de las unidades de unión se esquematiza a continuación:

Construcción de bibliotecas y selección primaria

Se usó la presentación en fago para aislar agentes de unión a CTLD de TNF. Las bibliotecas de presentación en fago usadas se basaron en el formato de CTLD monovalente de tetranectina (SEC ID N.º:97). La biblioteca combinatoria PhtCTLD-lb003 (documento WO/0248189, ejemplo 5) y una variante de esta biblioteca realizada esencialmente como PhtCTLD-lb003, pero que incluye dos oligonucleótidos aleatorizados adicionales para el bucle 1: TN-lib3-tprev, aleatorizado en posiciones de residuos de aminoácidos 116-122 de tetranectina (SEC ID N.º:98) y TN-lib2-tprev (SEC ID N.º: 99) y 2 oligonucleótidos adicionales para el bucle 4: TN-lib3-tpfo, aleatorizado en la posición 146-149 (SEC ID N.º:100) y TN-lib2-tpfo (SEC ID N.º:101) en la reacción de ensamblaje. Se realizaron dos ciclos de selección usando aproximadamente 1×10^{12} fagos como entrada y $10 \mu\text{g/ml}$ de TNF biotinilado en el primer ciclo de barrido y $1 \mu\text{g/ml}$ en el segundo.

Se realizaron las selecciones tal como sigue: $20 \mu\text{l}$ de perlas paramagnéticas cubiertas con estreptavidina (Dynal) se lavaron dos veces en 1 ml de PBS (PBS, $0,2 \text{ g}$ de KCl, $0,2 \text{ g}$ de KH_2PO_4 , 8 g de NaCl, $1,44 \text{ g}$ de Na_2HPO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$, agua hasta 1 l , y ajustado a pH 7,4 con NaOH), y se bloquearon en leche en polvo desnatada al 3% durante una hora a temperatura ambiente. Se mezclaron $250 \mu\text{l}$ de fago prebloqueado en leche en polvo desnatada al 3%/PBS con $250 \mu\text{l}$ de TNF biotinilado soluble y se dejó incubar a 37°C durante 30 minutos. Tras el lavado de las perlas de estreptavidina una vez en PBS, Tween 20 al 0,1 % y dos veces en PBS, se añadieron éstas a la reacción para capturar el fago unido a antígeno. Las perlas se lavaron de manera extensa con PBS, Tween 20 al 0,1 % y PBS, y se eluyeron los fagos unidos a antígeno de las perlas con $200 \mu\text{l}$ de ditiotreitól 50 mM durante 30 min. a temperatura ambiente. Se re infectaron los fagos eluidos en células TG1 de *E. coli* de crecimiento exponencial, antes de la colocación en placa y la titulación en placas de agar 2xTY que contienen glucosa al 2% y ampicilina $0,1 \text{ mg/ml}$.

La selección de clones individuales a partir de poblaciones seleccionadas mediante el análisis de unión a TNF alfa en ELISA se realizó esencialmente según se describe en el documento WO/0248189, excepto que el antígeno usado para cubrir en ELISA era TNF 5 µg/ml.

Se aisló un agente de unión a TNF alfa específico, denominado TN3-2, del segundo ciclo de selección (tabla 4).

5 Construcción de bibliotecas secundarias y selección dirigida por afinidad

Se investigó si la afinidad por TNF de TN3-2 podía mejorarse introduciendo una nueva variación de secuencia para TN3-2. Para la construcción de una biblioteca de mutantes de TN3-2, se usó el clon TN3-2 como molde y se sometió a nueva aleatorización en bucle 4 usando los oligonucleótidos TN-lib2-tpfo (SEC ID N.º:101) y TN-lib3-tpfo (SEC ID N.º: 100) (biblioteca TN3-2 loop4r). La construcción de bibliotecas se realizó esencialmente según se describe en el documento WO/0248189.

La biblioteca TN3-2loop4r se usó en 3 ciclos de selección dirigida por afinidad con concentraciones en disminución de TNF biotinilado (de 100 ng/ml a 0,1 ng/ml). Se realizó la selección según se describió anteriormente. Se realizó la selección de clones positivos según se describió anteriormente.

Resultados

15 La secuencia del clon parental TN3-2 era diferente de tetranectina en el bucle 1 (aminoácidos de tetranectina n.^{os} 116-122) y en el bucle 4 (aminoácidos de tetranectina n.^{os} 146-149). Tras tres ciclos de selección dirigida por afinidad en la biblioteca TN3-2loop4r, se identificaron clones positivos mediante análisis ELISA, y se mostró que 45 de 48 clones se unían a TNF alfa. Las secuencias del bucle 1 y bucle 4 de una selección de los clones de unión a TNF alfa identificados junto con sus correspondientes SEC ID N.^{os} se muestran en la tabla 4 (TN3-2-B, TN3-2-C, TN3-2-D).

20 TABLA 4: secuencias de aminoácidos en el bucle 1 y bucle 4 del clon parental TN3-2 y tres clones madurados por afinidad aislados de la biblioteca TN3-2loop4r

| Clon | SEC ID | Secuencia de bucle 1 | Secuencia de bucle 4 | Otras mutaciones ^a |
|--|----------------|----------------------|----------------------|-------------------------------|
| Tetranectina | SEC ID N.º:96 | DMAAEGT | GGKT | |
| TN3-2 | SEC ID N.º:102 | KVRSRYF | PRHT | V124 a M |
| TN3-2-B | SEC ID N.º:103 | KVRSRYF | PTNN | V124 a M, D165 a G |
| TN3-2-C | SEC ID N.º:104 | KVRSRYF | PTNR | |
| TN3-2-D | SEC ID N.º:105 | KVRSRYF | PNNR | V124 a I, D165 a G |
| ^a Mutaciones fuera de la secuencia de bucle 4 en tetranectina | | | | |

Ejemplo 10

25 **Mediciones de afinidad de agentes de unión a CTLD trimerizados para TNF**

Los insertos de ADN que codifican los agentes de unión a CTLD de TNF alfa monoméricos aislados según se describió en el ejemplo 7 se subclonaron en el vector de expresión pBAD de *E. coli* (Invitrogen Corp., EE.UU.). los agentes de unión a TNF alfa monoméricos recombinantes se expresaron en *E. coli* y se purificaron del periplasma según las instrucciones de los fabricantes. Se dializaron los monómeros purificados en Tris pH 10 mM 8,0, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM antes del análisis en BiaCore.

Con el fin de expresar el formato trimérico de los agentes de unión a TNF alfa, se escindieron insertos de ADN apropiados que codifican los agentes de unión a TNF alfa (del ejemplo 7) con las endonucleasas de restricción Bgl II y Mun I, y se subclonó el fragmento de ADN que contenía el bucle 1 y 4 en el ADN pT7H6FX-htlec de *E. coli* restringido con Bgl II y Mun I (según se esquematiza en el documento WO 02/48189, ejemplo 1 y figura 5).

35 Los agentes de unión a TNF alfa triméricos recombinantes se expresaron en *E. coli* y se realizó la purificación de los derivados de proteína de fusión no plegada esencialmente según se describe en el documento WO 94/18227, ejemplo 9.

40 Brevemente, se realizó el replegamiento de los agentes de unión a TNF alfa cargando las proteínas de fusión en columnas de ácido nitrilotriacético (NTA) cargadas con Ni²⁺ en urea 8 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM. Tras cargarse, las columnas se sometieron a un procedimiento de replegamiento cíclico. Los tampones de replegamiento usados fueron: tampón A de renaturalización (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM,

CaCl₂ 2 mM, glutatión reducido 2 mM y glutatión oxidado 0,2 mM) y tampón B de desnaturalización (urea 8 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, CaCl₂ 2 mM, glutatión reducido 3 mM). Se eluyeron las proteínas de fusión replegadas de las columnas en Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, EDTA 10 mM y se escindieron las proteínas de fusión con factor de coagulación de sangre bovina Xa (Protein Engineering Technology, Aarhus, Dinamarca) a 1:100 (p/p) a 4°C durante la noche. Las proteínas escindidas se llevaron en urea 8 M, tampón de acetato de sodio 25 mM (pH 5), NaCl 50 mM, tampón Tris-HCl 1 mM mediante filtración en gel en Sephadex G25 y se cargaron en columnas de 10 ml de SP-Sepharose (Amersham Biosciences) y se eluyeron en gradiente desde NaCl 50 mM hasta 500 M con respecto a 20 volúmenes de columna. Se combinaron las fracciones que contenían proteína escindida y monomérica, según se evalúa mediante análisis SDS/PAGE no reductor y se intercambio el tampón por Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM mediante filtración en gel en columnas PD10 (Amersham Biosciences).

Se realizó el análisis de unión de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 (BiaCore, Suecia). Se disolvió el anticuerpo de captura de TNF alfa (AHC3712, Biosource International) que va a inmovilizarse en acetato de Na 10 mM pH 5,0 y entonces se inmovilizó en un chip sensor CM5 BiaCore usando el kit Amine Coupling (BiaCore, Suecia).

Se realizó el análisis de unión a una velocidad de flujo de 5 µl/min. Antes de la carga de la muestra de proteínas, se equilibró el chip en Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, EDTA 50 µM y tensioactivo P20 al 0,005%. Se disolvió TNF alfa en Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, CaCl₂ a mM a 10 µg/ml y se inyectaron 10 µl. Se inyectaron alícuotas (20 µl) de agentes de unión a TNF alfa en el formato monomérico o trimérico usando la opción KINJECT. Se dejaron cinco min. de disociación antes de que se generara el chip con glicina 10 mM pH 2,5. Se sometió a prueba la unión de los agentes de unión a TNF alfa en seis concentraciones de proteínas diferentes, oscilando entre 1 nM y 200 nM. Se evaluaron los datos de unión usando el programa BIAevaluation versión 3.2 (BiaCore).

La tabla 5 muestra los valores cinéticos derivados de los datos de BiaCore. El efecto de avidéz de la trimerización de los agentes de unión a TNF alfa TN3-2-B, TN3-2-C, TN3-2-D se observa a partir del aumento de veces de la afinidad que se mueve desde los agentes de unión monoméricos hasta los correspondientes agentes de unión triméricos (TN-2-B, TN-2-C y TN-2-D).

TABLA 5

| Clon | SEC ID | $k_{on} M^{-1}s^{-1} *$ | $k_{off} s^{-3}$ | K_D^{003} | Aumento de veces |
|----------------------|----------------|-------------------------|----------------------------|-------------|------------------|
| TN-2-B (trimérico) | SEC ID N.º:106 | $3,02 \times 10^6$ | $7,36 \times 10^{-4} \sim$ | 0,24 nM | 304 |
| TN3-2-B (monomérico) | SEC ID N.º:103 | $1,4 \times 10^7$ | 0,923 | 73 nM | n.d. |
| TN-2-D (trimérico) | SEC ID N.º:107 | $5,06 \times 10^5$ | $2,07 \times 10^{-3}$ | 4,1 nM | 12 |
| TN3-2-D (monomérico) | SEC ID N.º:105 | $3,64 \times 10^5$ | 0,0185 | 50 nM | n.d. |
| TN-2-C (trimérico) | SEC ID N.º:108 | $8,84 \times 10^5$ | $3,53 \times 10^{-3}$ | 4 nM | 37 |
| TN3-2-C (monomérico) | SEC ID N.º:104 | $1,34 \times 10^5$ | 0,022 | 150 nM | n.d. |

Mediante la trimerización de los agentes de unión a TNF alfa se obtiene un aumento significativo de la afinidad (K_D). Por ejemplo, TN3-2-B monomérico tiene un valor de k_{off} muy bajo. Por el contrario a esto, la versión trimérica del mismo agente de unión a CTLD (TN-2-B), tiene un valor de k_{off} que está mejorado en más de 1000 veces. En general puede observarse que las constantes de disociación están mejoradas varias veces mediante la trimerización. Además, el clon parental poco afín TN3-2 del ejemplo 7 podía medirse sólo en BiaCore en su forma trimérica, ya que el monómero tenía una afinidad por debajo del límite de detección.

Referencias

Studier y Moffat (1986), Journal de Molecular Biology 189: 113-130.

Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. y Stüber, D. (1988), Bio/Technology 6:1321-1325.

Lorentsen, RH. *et al.* (2000) Biochemical Journal 347:83-87.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Borean Pharma A/S

<120> Proteínas de unión triméricas para citocinas triméricas

<130> 3005

<160> 109
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 33
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 1
 ctgccatgcg gccgccttca gggagaccgt ctg 33
 <210> 2
 10 <211> 58
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2
 gtgaccaggc ccagccggcc atgtaagtag ctaaggtacc gagccaccaa cccagaag 58
 15 <210> 3
 <211> 197
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3
 ggcccagccg gccatgtaag tagctaaggt accgagccac caaccagaa gccaagaag 60
 attgtaaattg ccaagaaaga tgttgtgaac acaaagatgt ttgaggagct caagagccgt 120
 ctggacacc c tggcccagga ggtggccctg ctgaaggagc agcagggcct gcagacggtc 180
 20 tccctgaagg cggccgc 197
 <210> 4
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 4
 gtgaccaggc ccagccggcc atgtaagtag ctaaggtacc attgtaaattg ccaagaaaga 60
 tg 62
 <210> 5
 <211> 170
 <212> ADN
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5

ES 2 367 749 T3

ggcccagccg gccatgtaag tagctaaggt accattgtaa atgccaagaa agatggtgtg 60
 aacacaaaga tgtttgagga gctcaagagc cgtctggaca ccttggccca ggaggtggcc 120
 ctgctgaagg agcagcaggc cctgcagacg gtctccctga aggcggccgc 170

<210> 6

<211> 32

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

ctgccataag cttactcag ggagaccgtc tg 32

<210> 7

<211> 51

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

gtgaccagga tccatgtaag tagctaaggt accgagccac caaccagaa g 51

<210> 8

15 <211> 191

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

ggatccatgt aagtagctaa ctgcaggtga gccaccaacc cagaagccca agaagattgt 60

aaatgccaaag aaagatggtg tgaacacaaa gatgtttgag gagctcaaga gccgtctgga 120

caccctggcc caggaggtgg ccttgcctgaa ggagcagcag gccttcgaga cggctctcct 180

gaagtaagct t 191

20 <210> 9

<211> 55

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

25 gtgaccagga tccatgtaag tagctaaggt accattgtaa atgccaagaa agatg 55

<210> 10

<211> 162

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 10

ES 2 367 749 T3

ggatccatgt aagtagctaa ggtaccattg taaatgccaa gaaagatggt gtgaacacaa 60
 agatgtttga ggagctcaag agccgtctgg acaccctggc ccaggaggtg gccctgctga 120
 aggagcagca gggccctgcag acggctctccc tgaagtaagc tt 162

<210> 11
 <211> 44
 <212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11
 gtgaccaggc ccagccggcc atggccggga gcacatgccg gctc 44
 <210> 12
 <211> 34

10 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12
 cgtgctgggt accggtgcag atgcggttct gttc 34
 <210> 13

15 <211> 274
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

ggcccagccg gccatggccg ggagcacatg cccgctcaga gaatactatg accagacagc 60
 tcagatgtgc tgcagcaagt gctcgccggg ccaacatgca aaagtcttct gtaccaagac 120
 ctccggacacc gtgtgtgact cctgtgagga cagcacatac acccagctct ggaactgggt 180
 tcccagagtgc ttgagctgtg gctcccgtct tagctctgac cagggtggaaa ctcaagcctg 240
 cactcgggaa cagaaccgca tctgcaccgg tacc 274

20 <210> 14
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14

25 cgtgctgggt accgggccta gcggtgcaga tgcggttct 39
 <210> 15
 <211> 283
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 367 749 T3

<400> 15

```

ggcccagccg gccatggccg ggagcacatg cgggctcaga gaatactatg accagacagc      60
tcagatgtgc tgcagcaagt gctcgccggg ccaacatgca aaagtcttct gtaccaagac      120
ctcggacacc gtgtgtgact cctgtgagga cagcacatac acccagctct ggaactgggt      180
tcccgagtgc ttgagctgtg gctcccgctg tagctctgac caggtggaaa ctcaagcctg      240
cactcgggaa cagaaccgca tctgcaccgc taggcccggg acc                          283

```

<210> 16

<211> 31

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

```

cgtgctgggt acccgccag taccagccg g          31

```

<210> 17

10 <211> 298

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

```

ggcccagccg gccatggccg ggagcacatg cgggctcaga gaatactatg accagacagc      60

tcagatgtgc tgcagcaagt gctcgccggg ccaacatgca aaagtcttct gtaccaagac      120
ctcggacacc gtgtgtgact cctgtgagga cagcacatac acccagctct ggaactgggt      180
tcccgagtgc ttgagctgtg gctcccgctg tagctctgac caggtggaaa ctcaagcctg      240
cactcgggaa cagaaccgca tctgcaccgc caggcccggc tggactgcg cgggtacc        298

```

15 <210> 18

<211> 29

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

20 cgtgctgggt accctctgc ttgctcagc 29

<210> 19

<211> 316

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 19

ggcccagccg gccatggccg ggagcacatg ccggctcaga gaatactatg accagacagc 60
 tcagatgtgc tgcagcaagt gctcgccggg ccaacatgca aaagtcttct gtaccaagac 120
 ctccgacacc gtgtgtgact cctgtgagga cagcacatac accagctct ggaactgggt 180
 tcccagtgctc ttgagctgtg gctcccgtg tagctctgac caggtggaaa ctcaagcctg 240
 cactcgggaa cagaaccgca tctgcacctg caggcccggc tggactgctg cgctgagcaa 300
 gcaggagggg ggtacc 316

<210> 20

<211> 44

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

cgctgctggg acctgcagcc agccgagccc cctctgctt gctc 44

<210> 21

<211> 331

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

ggcccagccg gccatggccg ggagcacatg ccggctcaga gaatactatg accagacagc 60
 tcagatgtgc tgcagcaagt gctcgccggg ccaacatgca aaagtcttct gtaccaagac 120
 ctccgacacc gtgtgtgact cctgtgagga cagcacatac accagctct ggaactgggt 180
 tcccagtgctc ttgagctgtg gctcccgtg tagctctgac caggtggaaa ctcaagcctg 240
 cactcgggaa cagaaccgca tctgcacctg caggcccggc tggactgctg cgctgagcaa 300
 gcaggagggg gctcggctgg ctgcaggtac c 331

<210> 22

15 <211> 31

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

cgctgctggg accggacgtg gacgtgcaga c 31

20 <210> 23

<211> 529

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

ggcccagccg gccatggccg ggagcacatg cgggctcaga gaatactatg accagacagc 60
 tcagatgtgc tgcagcaagt gctcgccggg ccaacatgca aaagtcttct gtaccaagac 120
 ctcggacacc gtgtgtgact cctgtgagga cagcacatac acccagctct ggaactgggt 180
 tcccagagtgc ttgagctgtg gctcccgctg tagctctgac caggtggaaa ctcaagcctg 240
 cactcgggaa cagaaccgca tctgcacctg caggcccggc tggtagtgc cgctgagcaa 300
 gcaggagggg tgccggctgt gcgcgccctt gcgcaagtgc cgcccgggct tcggcgtggc 360
 cagaccagga actgaaacat cagacgtggt gtgcaagccc tgtgccccgg ggacgttctc 420
 caacacgact tcatccacgg atatttgag gccccaccag atctgtaacg tggtagccat 480
 ccctgggaat gcaagcaggg atgcagtctg cacgtccacg tccggtacc 529

<210> 24

<211> 44

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

gtgaccaggc ccagccggcc atggccgact cctgtgagga cagc 44

<210> 25

<211> 157

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

ggcccagccg gccatggccg actcctgtga ggacagcaca tacaccagc tctggaactg 60
 ggttcccagag tgcttgagct gtggctcccg ctgtagctct gaccaggtgg aaactcaagc 120
 ctgcactcgg gaacagaacc gcatctgcac cgggtacc 157

<210> 26

15 <211> 166

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

ggcccagccg gccatggccg actcctgtga ggacagcaca tacaccagc tctggaactg 60
 ggttcccagag tgcttgagct gtggctcccg ctgtagctct gaccaggtgg aaactcaagc 120
 ctgcactcgg gaacagaacc gcatctgcac cgctaggccc ggtacc 166

20 <210> 27

<211> 182

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 27

```

ggcccagccg gccatggcct gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact    60
gggttcccga gtgcttgagc tgtggctccc gctgtagctc tgaccagggtg gaaactcaag    120
cctgcactcg ggaacagaac cgcatctgca cctgcaggcc cggctggtac tgcgcgggta    180
cc                                                                                   182
    
```

<210> 28

<211> 199

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 28

```

ggcccagccg gccatggccg actcctgtga ggacagcaca tacaccagc tctggaactg    60
ggttcccagag tgcttgagct gtggctcccg ctgtagctct gaccagggtg aaactcaagc    120
ctgcactcgg gaacagaacc gcatctgcac ctgcaggccc ggctggtact gcgcgctgag    180
caagcaggag gggggtacc                                                                 199
    
```

<210> 29

10 <211> 214

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

```

ggcccagccg gccatggccg actcctgtga ggacagcaca tacaccagc tctggaactg    60
ggttcccagag tgcttgagct gtggctcccg ctgtagctct gaccagggtg aaactcaagc    120
ctgcactcgg gaacagaacc gcatctgcac ctgcaggccc ggctggtact gcgcgctgag    180
caagcaggag ggggctcggc tggctgcagg tacc                                                                 214
    
```

15 <210> 30

<211> 412

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

ggcccagccg gccatggccg actcctgtga ggacagcaca tacacccagc tctggaactg 60
 ggttcccagag tgcttgagct gtggctcccg ctgtagctct gaccaggtgg aaactcaagc 120
 ctgcactcgg gaacagaacc gcatctgcac ctgcaggccc ggctggtact gcgcgctgag 180
 caagcaggag ggggtgccggc tgtgcgcgcc gctgcgcaag tgccgcccgg gcttcggcgt 240
 ggccagacca ggaactgaaa catcagacgt ggtgtgcaag cctgtgccc cggggacgtt 300
 ctccaacacg acttcatcca cggatatttg caggccccac cagatctgta acgtggtggc 360
 catccctggg aatgcaagca gggatgcagt ctgcacgtcc acgtccgta cc 412

<210> 31

<211> 41

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

gccagggatc catcgagggt agggggagca catgccggt c 41

<210> 32

<211> 278

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

gccagggatc catcgagggt agggggagca catgccggt cagagaatac tatgaccaga 60
 cagctcagat gtgctgcagc aagtgtctgc cgggccaaca tgcaaaagtc ttctgtacca 120
 agacctcgga caccgtgtgt gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact 180
 gggttcccga gtgcttgagc tgtggctccc gctgtagctc tgaccaggtg gaaactcaag 240
 cctgcactcg ggaacagaac cgcactctgca ccggtacc 278

<210> 33

15 <211> 287

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 33

gccagggatc catcgagggt agggggagca catgccggt cagagaatac tatgaccaga 60
 cagctcagat gtgctgcagc aagtgtctgc cgggccaaca tgcaaaagtc ttctgtacca 120
 agacctcgga caccgtgtgt gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact 180
 gggttcccga gtgcttgagc tgtggctccc gctgtagctc tgaccaggtg gaaactcaag 240
 cctgcactcg ggaacagaac cgcactctgca ccgctaggcc cgggtacc 287

20 <210> 34

<211> 302

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 34

```

gccagggatc catcgagggt aggggggagca catgccggct cagagaatac tatgaccaga      60
cagctcagat gtgctgcagc aagtgctcgc cgggccaaca tgcaaaagtc ttctgtacca      120
agacctcgga caccgtgtgt gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact      180
gggttcccga gtgcttgagc tgtggctccc gctgtagctc tgaccagggtg gaaactcaag      240
cctgcactcg ggaacagaac cgcactctgca cctgcaggcc cggctggtac tgcgcgggta      300
cc                                                                                   302

```

5

<210> 35

<211> 320

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 35

```

gccagggatc catcgagggt aggggggagca catgccggct cagagaatac tatgaccaga      60
cagctcagat gtgctgcagc aagtgctcgc cgggccaaca tgcaaaagtc ttctgtacca      120
agacctcgga caccgtgtgt gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact      180
gggttcccga gtgcttgagc tgtggctccc gctgtagctc tgaccagggtg gaaactcaag      240
cctgcactcg ggaacagaac cgcactctgca cctgcaggcc cggctggtac tgcgcgctga      300
gcaagcagga ggggggtacc                                                                 320

```

10

<210> 36

<211> 335

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 36

```

gccagggatc catcgagggt aggggggagca catgccggct cagagaatac tatgaccaga      60
cagctcagat gtgctgcagc aagtgctcgc cgggccaaca tgcaaaagtc ttctgtacca      120
agacctcgga caccgtgtgt gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact      180
gggttcccga gtgcttgagc tgtggctccc gctgtagctc tgaccagggtg gaaactcaag      240
cctgcactcg ggaacagaac cgcactctgca cctgcaggcc cggctggtac tgcgcgctga      300
gcaagcagga gggggctcgg ctggctgcag gtacc                                                                 335

```

15

<210> 37

<211> 533

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

```

gccagggatc catcgagggt aggggggagca catgccggct cagagaatac tatgaccaga      60
cagctcagat gtgctgcagc aagtgctcgc cgggccaaca tgcaaaagtc ttctgtacca      120
agacctegga caccgtgtgt gactcctgtg aggacagcac atacaccag ctctggaact      180
gggttcccgga gtgcttgagc tgtggctccc gctgtagctc tgaccagggt gaaactcaag      240
cctgcactcg ggaacagAAC cgcactctgca ectgcaggcc cggctggtac tgcgcgctga      300
gcaagcagga ggggtgccgg ctgtgcgcgc cgctgcgcaa gtgccgcccg ggcttcggcg      360
tggccagacc aggaactgaa acatcagacg tgggtgtgcaa gccctgtgcc cgggggacgt      420
tctccaacac gacttcatcc acggatattt gcaggcccca ccagatctgt aacgtggtgg      480
ccatccctgg gaatgcaagc agggatgcag tctgcacgtc cacgtccggt acc              533

```

5 <210> 38

<211> 44

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

10 gccagggatc catcgagggt aggggcgact cctgtgagga cagc 44

<210> 39

<211> 159

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 39

```

ggatccatcg agggtagggg cgactcctgt gaggacagca catacaccca gctctggaac      60
tgggttcccg agtgcttgag ctgtggctcc cgctgtagct ctgaccagggt ggaaactcaa      120
gcctgcactc gggaacagaa ccgcatctgc accggtacc                                159

```

<210> 40

<211> 168

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

```

ggatccatcg agggtagggg cgactcctgt gaggacagca catacaccca gctctggaac      60
tgggttcccg agtgcttgag ctgtggctcc cgctgtagct ctgaccagggt ggaaactcaa      120
gcctgcactc gggaacagaa ccgcatctgc accgctagcc ccggtacc                                168

```

<210> 41

<211> 183

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 41

```

ggatccatcg agggtagggg cgactcctgt gaggacagca catacaccca gctctggaac      60
tgggttcccg agtgcttgag ctgtggctcc cgctgtagct ctgaccaggt ggaaactcaa      120
gcctgcactc gggaacagaa ccgcactctgc acctgcaggc cggctggta ctgcgcgggt      180
acc                                                                                   183
    
```

<210> 42

<211> 201

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

```

ggatccatcg agggtagggg cgactcctgt gaggacagca catacaccca gctctggaac      60
tgggttcccg agtgcttgag ctgtggctcc cgctgtagct ctgaccaggt ggaaactcaa      120
gcctgcactc gggaacagaa ccgcactctgc acctgcaggc cggctggta ctgcgcgctg      180
agcaagcagg aggggggtac c                                                                                   201
    
```

<210> 43

<211> 216

15 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 43

```

ggatccatcg agggtagggg cgactcctgt gaggacagca catacaccca gctctggaac      60
tgggttcccg agtgcttgag ctgtggctcc cgctgtagct ctgaccaggt ggaaactcaa      120
gcctgcactc gggaacagaa ccgcactctgc acctgcaggc cggctggta ctgcgcgctg      180

agcaagcagg agggggctcg gctggctgca ggtacc                                                                 216
    
```

<210> 44

20 <211> 414

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 44

ES 2 367 749 T3

ggatccatcg agggtagggg cgactcctgt gaggacagca catacaccea gctctggaac 60
 tgggttcccg agtgcttgag ctgtggctcc cgctgtagct ctgaccaggt ggaaactcaa 120
 gcctgcactc gggaacagaa ccgcatctgc acctgcaggc ccggctggta ctgcgcgctg 180
 agcaagcagg aggggtgccc gctgtgcgcg ccgctgcgca agtgccgccc gggcttcggc 240
 gtggccagac caggaactga aacatcagac gtggtgtgca agccctgtgc cccggggacg 300
 ttctccaaca cgacttcac caccgatatt tgcaggcccc accagatctg taacgtggtg 360
 gccatccctg ggaatgcaag cagggatgca gtctgcacgt ccacgtccgg tacc 414

<210> 45

<211> 41

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 45

gccagagatc tatcgagggt agggaggtgc agctggtgga g 41

<210> 46

<211> 59

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 46

ctggtcggta ccgcatccgc cgccaccact cgagacggtg accagagtac cttggcccc 59

<210> 47

15 <211> 62

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 47

gcaggcggat ccgggggagg aggtagtggc ggtggtggat cagacatcca gatgaccag 60

tc 62

20 <210> 48

<211> 33

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 48

25 ccgagcggta ccttgattt ccacctggt ccc 33

<210> 49

<211> 754

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 49

```

agatctatcg agggtaggga ggtgcagctg gtggagtctg ggggaggctt ggtacagccc      60
ggcagggtccc tgagactctc ctgtgcggcc tctggattca cctttgatga ttatgccatg      120
cactgggtcc  ggcaagctcc agggaagggc ctggaatggg tctcagctat cacttggaat      180
agtggtcaca tagactatgc ggactctgtg gagggccgat tcaccatctc cagagacaac      240
gccaaagaact ccctgtatct gcaaatgaac agtctgagag ctgaggatac ggccgtatat      300
tactgtgcga aagtctcgta ccttagcacc gcgtcctccc ttgactattg gggccaaggt      360
accctggtea cegtctcgag tggtaggggc gggatccggg ggaggaggta gtggcgggtg      420
tggatcagac atccagatga cccagtctcc atcctccctg tctgcatctg taggggacag      480
agtcaccatc acttgtcggg caagtcaggg catcagaaat tacttagcct ggtatcagca      540
aaaaccaggg aaagccccta agctcctgat ctatgctgca tccactttgc aatcaggggt      600
cccatctcgg ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc actctacca tcagcagcct      660
acagcctgaa gatgttgcaa cttattactg tcaaaggat aaccgtgcac cgtatacttt      720
tggccagggg accaaggtgg aatcaaagg tacc                                     754

```

5 <210> 50

<211> 48

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 50

10 ccgagcggta ccagatccac cgcccccttt gattccacc ttgtccc 48

<210> 51

<211> 769

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 51

ES 2 367 749 T3

agatctatcg agggtaggga ggtgcagctg gtggagtctg ggggaggctt ggtacagccc 60
 ggcaggtccc tgagactctc ctgtgcggcc tctggattca cctttgatga ttatgccatg 120
 cactgggtcc ggcaagctcc agggaagggc ctggaatggg tctcagctat cacttggaat 180
 agtggtcaca tagactatgc ggactctgtg gagggccgat tcaccatctc cagagacaac 240
 gccagaact cctgtatct gcaaatgaac agtctgagag ctgaggatac ggccgtatat 300
 tactgtgcga aagtctcgta ccttagcacc gcgtcctccc ttgactattg gggccaaggt 360
 accctggcca cegtctcgag tgggtggcggc gggatccggg ggaggaggta gtggcgggtg 420
 tggatcagac atccagatga cccagtctcc atcctccctg tctgcatctg taggggacag 480
 agtcaccatc acttgtcggg caagtccagg catcagaaat tacttagcct ggtatcagca 540
 aaaaccaggg aaagccccta agctcctgat ctatgctgca tccactttgc aatcaggggt 600
 cccatctcgg ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc actctacca tcagcagcct 660
 acagcctgaa gatgttgcaa cttattactg tcaaaggtat aaccgtgca cgtatacttt 720
 tggccagggg accaaggtgg aaatcaaagg gggcgggtgga tctggtacc 769

<210> 52

<211> 29

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 52

gccagtgatc agaggtgcag ctgggtggag 29

<210> 53

10 <211> 33

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 53

cctcgaagct taittgattt ccaccttgg ccc 33

15 <210> 54

<211> 743

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 54

ES 2 367 749 T3

tgatecagagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcccgg caggtccttg 60
 agactctcct gtgcggcctc tggattcacc tttgatgatt atgccatgca ctgggtccgg 120
 caagctccag ggaagggcct ggaatgggtc tcagctatca cttggaatag tggtcacata 180
 gactatgcgg actctgtgga gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaactcc 240
 ctgtatctgc aatgaacag tctgagagct gaggatcgg ccgtatatta ctgtgcgaaa 300
 gtctcgtacc ttagcaccgc gtctccctt gactattggg gccaaaggtac cctggtcacc 360
 gtctcagagt gtggcggcgg gatccggggg aggaggtagt ggcgggtggtg gatcagacat 420
 ccagatgacc cagtctccat cctccctgtc tgcattctgta ggggacagag tcaccatcac 480
 ttgtcgggca agtcagggca tcagaaatta cttagcctgg taccagcaa aaccagggaa 540
 agcccctaag ctctgatct atgctgcate cactttgcaa tcaggggtcc catctcggtt 600
 cagtggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccatc agcagcctac agcctgaaga 660
 tgttgcaact tattactgtc aaaggtataa ccgtgcaccg tatacttttg gccaggggac 720
 caaggtggaa atcaaataag ctt 743

<210> 55

<211> 44

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 55

gccagtgatc aggaggtggc gggctgagg tgcagctggt ggag 44

<210> 56

<211> 758

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 56

tgatcaggag gtggcgggtc tgagggtgcag ctgggtggagt ctgggggagg cttggtacag 60
 cccggcaggt ccctgagact ctctgtgctg gectctggat tcacctttga tgattatgcc 120
 atgcactggg tccggcaagc tccaggggaag ggctctggaat gggctctcagc tactacttgg 180
 aatagtggtc acatagacta tgcggactct gtggagggcc gattcaccat ctccagagac 240
 aacgccaaga actccctgta tctgcaaatg aacagtctga gagctgagga tacggccgta 300
 tattactgtg cgaaagtctc gtaccttagc accgcgtcct cccttgacta ttggggccaa 360
 ggtaccctgg tcaccgtctc gagtgggtggc ggcgggatcc gggggaggag gtagtggcgg 420
 tgggtggatca gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtagggga 480
 cagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca gggcatcaga aattacttag cctggtatca 540
 gcaaaaacca gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg 600
 ggtcccatct cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag 660
 cctacagcct gaagatgttg caactatta ctgtcaaagg tataaccgtg cacccgtatac 720
 ttttggccag gggaccaagg tggaaatcaa ataagctt 758

<210> 57

<211> 38

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 57

gccagagatc tatcgagggt aggatgagtg gcctgggc 38

<210> 58

<211> 18

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 58

catgcaggta cccagcag 18

<210> 59

15 <211> 18

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 59

ctgctgggta cctgcatg 18

20 <210> 60

<211> 32

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 60

cggcacggta ccgctcctga gctgttctc ac 32

<210> 61

<211> 354

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 61

| | |
|--|-----|
| agatctatcg agggtaggat gagtggcctg ggccggagca ggcgaggtgg ccggagccgt | 60 |
| gtggaccagg aggagcgett tccacagggc ctgtggacgg gggtaggctat gagatcctgc | 120 |
| cccgaagagc agtactggga tctctgctg ggtacctgca tgcctgcaa aaccatttgc | 180 |
| aaccatcaga gccagcgcac ctgtgcagcc ttctgcaggt cactcagctg ccgcaaggag | 240 |
| caaggcaagt tctatgacca tctcctgagg gactgcatca gctgtgcctc catctgtgga | 300 |
| cagcaccta agcaatgtgc atacttctgt gagaacaagc tcaggagcgg tacc | 354 |

<210> 62

10 <211> 31

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 62

cggcacggta ccaaggtca ctggctct g 31

15 <210> 63

<211> 366

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 63

| | |
|--|-----|
| agatctatcg agggtaggat gagtggcctg ggccggagca ggcgaggtgg ccggagccgt | 60 |
| gtggaccagg aggagcgett tccacagggc ctgtggacgg gggtaggctat gagatcctgc | 120 |
| cccgaagagc agtactggga tctctgctg ggtacctgca tgcctgcaa aaccatttgc | 180 |
| aaccatcaga gccagcgcac ctgtgcagcc ttctgcaggt cactcagctg ccgcaaggag | 240 |
| caaggcaagt tctatgacca tctcctgagg gactgcatca gctgtgcctc catctgtgga | 300 |
| cagcaccta agcaatgtgc atacttctgt gagaacaagc tcaggagccc agtgaacctt | 360 |
| ggtacc | 366 |

20

<210> 64

<211> 31

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 64

cggcacggta cctccactcc gctgtctct g 31

<210> 65

<211> 396

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 65

agatctatcg agggtaggat gaggggcctg ggccggagca ggcgaggtgg ccggagccgt 60
gtggaccagg aggagcgctt tccacagggc ctgtggacgg gggtaggctat gagatcctgc 120

cccgaagagc agtactggga tctctgctg ggtacctgca tgtcctgcaa aaccatttgc 180
aaccatcaga gccagcgcac ctgtgcagcc ttctgcaggt cactcagctg ccgcaaggag 240
caaggcaagt tctatgacca tctcctgagg gactgcatca gctgtgcctc catctgtgga 300
cagcaccta agcaatgtgc atacttctgt gagaacaagc tcaggagccc agtgaacctt 360
ccaccagagc tcaggagaca gcggagtgga ggtacc 396

<210> 66

10 <211> 36

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 66

cggcacggta ccagggtca acagactaa caaaag 36

15 <210> 67

<211> 426

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 67

agatctatcg agggtaggat gaggggcctg ggccggagca ggcgaggtgg ccggagccgt 60
gtggaccagg aggagcgctt tccacagggc ctgtggacgg gggtaggctat gagatcctgc 120
cccgaagagc agtactggga tctctgctg ggtacctgca tgtcctgcaa aaccatttgc 180
aaccatcaga gccagcgcac ctgtgcagcc ttctgcaggt cactcagctg ccgcaaggag 240
caaggcaagt tctatgacca tctcctgagg gactgcatca gctgtgcctc catctgtgga 300
cagcaccta agcaatgtgc atacttctgt gagaacaagc tcaggagccc agtgaacctt 360
ccaccagagc tcaggagaca gcggagtgga gaagttgaaa acaattcaga caactcggga 420
ggtacc 426

20

<210> 68

<211> 31

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 68 31

cggcacggta ccgctgtaga ccagggccac c

<210> 69

<211> 519

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 69

| | |
|---|-----|
| agatctatcg agggtaggat gagtggcctg ggccggagca ggcgaggtgg ccggagccgt | 60 |
| gtggaccagg aggagcgctt tccacagggc ctgtggacgg ggttggtat gagatcctgc | 120 |
| cccgaagagc agtactggga tctctgctg ggtacctgca tgtcctgcaa aaccatttgc | 180 |
| aaccatcaga gccagcgcac ctgtgcagcc ttctgcaggt cactcagctg ccgcaaggag | 240 |
| caaggcaagt tctatgacca tctcctgagg gactgcatca gctgtgcctc catctgtgga | 300 |

| | |
|---|-----|
| cagcacccta agcaatgtgc atacttctgt gagaacaagc tcaggagccc agtgaacctt | 360 |
| ccaccagagc tcaggagaca gcggagtgga gaagttgaaa acaattcaga caactcggga | 420 |
| aggtagcaag gattggagca cagaggctca gaagcaagtc cagctctccc ggggctgaag | 480 |
| ctgagtgcag atcaggtggc cctggtctac agcgggtacc | 519 |

<210> 70

<211> 41

15 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 70

ggccagggat ccatcgaggg taggggggag caagcggcag g 41

<210> 71

20 <211> 31

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 71

cggtgcggta ccgggcaaaa gcagccggaa g 31

25 <210> 72

<211> 186

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 72

```

ggatccatcg agggtagggg ggagcaagcg ccaggcaccg cccctgctc ccgcggcagc      60
tcctggagcg cggacctgga caagtgcattg gactgcgcgt cttgcagggc gcgaccgcac      120
agcgacttct gcctgggctg cgctgcagca cctcctgccc ccttcgggct gctttggccc      180
ggtacc                                          186
    
```

5

<210> 73

<211> 41

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 73

```

ggccagggat ccatcgaggg taggatgagg cgagggcccc g      41
    
```

<210> 74

<211> 28

<212> ADN

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 74

```

cggcgcgta ccgagcagcc cgggcagg      28
    
```

<210> 75

<211> 258

20 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 75

```

ggatccatcg agggtaggat gaggcgaggg ccccgagacc tgcggggcag ggacgcgcca      60
gccccacgc cctgcgtccc ggccgagtgc ttcgacctgc tggcgcgcca ctgcgtggcc      120
tgcgggctcc tgcgcacgcc gcggccgaaa ccggccgggg ccagcagccc tgcgcccagg      180
acggcgtgc agccgcagga gtcggtgggc gcgggggccg gcgaggcggc gctgcccctg      240
cccgggctgc tcggtacc                                          258
    
```

<210> 76

25 <211> 235

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 76

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
35 40 45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145 150 155 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
165 170 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
180 185 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr

195

200

205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
210 215 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp
225 230 235

<210> 77

<211> 185

ES 2 367 749 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 77

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
35 40 45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145 150 155 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
165 170 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg
180 185

5 <210> 78

<211> 163

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 78

ES 2 367 749 T3

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
35 40 45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145 150 155 160

Gln Ile Cys

<210> 79

<211> 142

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 79

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
35 40 45

ES 2 367 749 T3

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
 50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
 65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
 85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
 100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
 115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys
 130 135 140

<210> 80

<211> 157

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 80

ES 2 367 749 T3

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 20 25 30

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95

Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 100 105 110

Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
 115 120 125

Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140

Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155

<210> 81

<211> 51

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 81

Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys Leu Val Asn Ala Lys Lys Asp
 1 5 10 15

Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr
 20 25 30

Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr
 35 40 45

Val Cys Leu
 50

<210> 82
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> cebador oligonucleotidico
 <400> 82
 ggcacaggat ccatggcca ggtggcattt acacctac 39
 <210> 83

10 <211> 33
 <212> ADN
 <213>Artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleotidico

15 <400> 83
 caccacggta ccatctggt gggcctgca aat 33
 <210> 84
 <211> 738
 <212> ADN

20 <213> Artificial
 <220>
 <223> AD1D4-l162-tripB
 <400> 84

atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgcc cggagcccgg gagcacatgc 60
 cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaatg ctgcccgggc 120
 caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac 180

agcacataca cccagctctg gaactggggt cccgagtgct tgagctgtgg ctcccgctgt 240
 agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc 300
 aggcccggct ggtactgccc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgcccgtg 360
 cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg 420
 tgcaagccct gtgcccggg gaogttctcc aacacgactt catccacgga tatttgagg 480
 ccccaccaga tccgtaccga gccaccaacc cagaagccca agaagattgt aatgccaaag 540
 aaagatggtg tgaacacaaa gatgtttgag gagctcaaga gccgtctgga caccctggcc 600
 caggaggtgg ccctgctgaa ggagcagcag gccctgcaga cggctctcct gaagggtcta 660
 gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg aatagcgccg tcgaccatca tcatcatcat 720
 cattgaaagc tgaattcc 738

<210> 85

<211> 51

<212> ADN

5 <213>Artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

<400> 85

caccacggta cggaggaac cggaggacgt ggacgtgcag actgcatcca t 51

10 <210> 86

<211> 810

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> AD1D4-GSS-tripB

<400> 86

ES 2 367 749 T3

atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccgg gagcacatgc 60
 cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaatg ctcgccgggc 120
 caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac 180
 agcacataca ccagctctg gaactgggtt cccgagtget tgagctgtgg ctcccgtgt 240
 agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc 300
 aggcccggt ggtactgccc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgtg 360
 cgcaagtgcc gccccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg 420
 tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgcagg 480
 ccccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc 540
 acgtccacgt cctccggttc ctccggtacc gagccaccaa ccagaagcc caagaagatt 600
 gtaaattgcca agaaagatgt tgtgaacaca aagatgtttg aggagctcaa gagccgtctg 660
 gacaccctgg cccaggaggt ggcctgctg aaggagcagc aggcctgca gacggtctcc 720

ctgaagggtc tagaacaanaa actcatctca gaagaggatc tgaatagcgc cgtcgacct 780
 catcatcatc atcattgaaa gctgaattcc 810

<210> 87

<211> 39

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotidico

<400> 87

agattggta ccgtgccag tgctccctc agctggggg 39

10 <210> 88

<211> 957

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> AD1D4-D235-tripB

<400> 88

ES 2 367 749 T3

| | |
|---|-----|
| atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccgg gagcacatgc | 60 |
| eggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaatg ctgcccgggc | 120 |
| caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac | 180 |
| agcacataca ccagctctg gaactgggtt cccgagtgct tgagctgtgg ctcccgctgt | 240 |
| agctctgacc aggtggaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc | 300 |
| aggcccggct ggtactgccc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgctg | 360 |
| cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg | 420 |
| tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgcagg | 480 |
| cccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc | 540 |
| acgtccacgt cccccaccg gagtatggcc ccaggggcag tacacttacc ccagccagtg | 600 |
| tccacacgat cccaacacac gcagccaact ccagaacca gcactgctcc aagcacctcc | 660 |
| ttctgctcc caatgggccc cagcccccca gctgaaggga gcactggcga cggtagccgag | 720 |
| ccaccaacc agaagcccaa gaagattgta aatgccaaaga aagatggtgt gaacacaaag | 780 |
| atgtttgagg agctcaagag ccgtctggac accctggccc aggaggtggc cctgctgaag | 840 |
| gagcagcagg ccctgcagac ggtctccctg aagggtctag aacaaaaact catctcagaa | 900 |
| gaggatctga atagcgcctg cgaccatcat catcatcacc attgaaagct gaattcc | 957 |

<210> 89

<211> 711

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> AD1D4-I162-I10-TripB

<400> 89

ES 2 367 749 T3

atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgcc cggagcccgg gagcacatgc 60
 cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaatg ctgcgccggc 120
 caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac 180
 agcacataca cccagctctg gaactgggtt cccgagtgct tgagctgtgg ctcccgtgt 240
 agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc 300
 aggcccggct ggtactgctg gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgctg 360
 cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg 420
 tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgcagg 480
 ccccaccaga tcggtaccat tgtaaatgcc aagaaagatg ttgtgaacac aaagatgttt 540
 gaggagctca agagccgtct ggacaccctg gcccaggagg tggccctgct gaaggagcag 600
 caggccctgc agacggtctc cctgaagggt ctagaacaaa aactcatctc agaagaggat 660
 ctgaatagcg ccgctgacca tcatcatcat catcattgaa agctgaattc c 711

<210> 90

<211> 711

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> AD1D4-GSS-I10-tripB

<400> 90

atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgcc cggagcccgg gagcacatgc 60
 cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaatg ctgcgccggc 120
 caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac 180
 agcacataca cccagctctg gaactgggtt cccgagtgct tgagctgtgg ctcccgtgt 240
 agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc 300
 aggcccggct ggtactgctg gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgctg 360
 cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg 420
 tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgcagg 480
 ccccaccaga tcggtaccat tgtaaatgcc aagaaagatg ttgtgaacac aaagatgttt 540
 gaggagctca agagccgtct ggacaccctg gcccaggagg tggccctgct gaaggagcag 600
 caggccctgc agacggtctc cctgaagggt ctagaacaaa aactcatctc agaagaggat 660
 ctgaatagcg ccgctgacca tcatcatcat catcattgaa agctgaattc c 711

10 <210> 91

<211> 930

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> AD1D4-D235-I10-tripB

<400> 91

```

atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccgg gagcacatgc      60
cggetcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaatg ctgcgccgggc      120
caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac      180
agcacataca cccagctctg gaactggggt cccgagtgtc tgagctgtgg ctcccgtgt      240
agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc      300
aggcccggct ggtactgctc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgctg      360
cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg      420
tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgacgg      480
ccccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc      540
acgtccacgt cccccacccg gagtatggcc ccaggggcag tacacttacc ccagccagtg      600
tccacacgat cccaacacac gcagccaact ccagaacca gcaactgctcc aagcacctcc      660
ttctgctcc caatgggcc cagcccccca gctgaaggga gcaactggcg cggtaccatt      720
gtaaatagcca agaaagatgt tgtgaacaca aagatgtttg aggagctcaa gagccgtctg      780
gacaccctgg cccaggaggt ggccctgctg aaggagcagc aggccctgca gacggctctc      840
ctgaagggtc tagaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgaatagcgc cgtcgaacct      900
catcatcatc atcattgaaa gctgaattcc                                     930

```

5

<210> 92

<211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> pKpnl-V17

<400> 92

gacggtaccg ttgtgaacac aaagatgttt g 31

<210> 93

15

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> pBAD6H

20

<400> 93

ggctcggaat tcaatgatga tgatgatgat ggtcg 35

<210> 94

<211> 762

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> AD1D4-GSS-V17-tripB

<400> 94

| | |
|--|-----|
| atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccgg gagcacatgc | 60 |
| cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaatg ctccgccgggc | 120 |
| caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac | 180 |
| agcacatata ccagctctg gaactggggt cccgagtgct tgagctgtgg ctcccgtgt | 240 |
| agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc | 300 |
| aggcccggct ggtactgccc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgctg | 360 |
| cgcaagtgcc gccccggcct cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg | 420 |
| tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgcagg | 480 |
| ccccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc | 540 |
| acgtccacgt cctccgggtc ctccggtacc gttgtgaaca caaagatggt tgaggagctc | 600 |
| aagagccgtc tggacacccct ggcccaggag gtggccctgc tgaaggagca gcaggccctg | 660 |
| cagacggctc ccctgaaggg tctagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatagc | 720 |
| gccgtegacc atcatcatca tcatcattga aagctgaatt cc | 762 |

10 <210> 95

<211> 909

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> AD1D4-D235-V17-tripB

<400> 95

ES 2 367 749 T3

atgggatcca tggcccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccgg gagcacatgc 60
 cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaatg ctgcgccggc 120
 caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac 180
 agcacataca cccagctctg gaactggggt cccgagtgct tgagctgtgg ctcccgetgt 240
 agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc 300
 aggcccggct ggtactgcgc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgctg 360
 cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg 420
 tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgcagg 480
 ccccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc 540
 acgtccacgt cccccaccg gagtatggcc ccaggggcag tacacttacc ccagccagtg 600
 tccacacgat cccaacacac gcagccaact ccagaacca gcactgetcc aagcacctcc 660
 ttctgtctcc caatgggccc cagcccccca gctgaaggga gcactggcga cggtagcggt 720
 gtgaacacaa agatgtttga ggagctcaag agccgtctgg acaccctggc ccaggagggtg 780
 gccctgctga aggagcagca ggcctgcag acggtctccc tgaagggtct agaacaaaaa 840
 ctcatctcag aagaggatct gaatagcgc gtcgaccatc atcatcatca tcattgaaag 900

ctgaattcc 909

<210> 96

<211> 181

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 96

ES 2 367 749 T3

Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp
1 5 10 15

Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr
20 25 30

Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr
35 40 45

Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys Phe Leu Ala Phe
50 55 60

Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp Cys Ile Ser Arg
65 70 75 80

Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu Asn Asp Ala Leu
85 90 95

Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala Glu Ile Trp Leu
100 105 110

Gly Leu Asn Asp Met Ala Ala Glu Gly Thr Trp Val Asp Met Thr Gly
115 120 125

Ala Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile Thr Ala Gln Pro
130 135 140

Asp Gly Gly Lys Thr Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser Gly Ala Ala Asn
145 150 155 160

Gly Lys Trp Phe Asp Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu Pro Tyr Ile Cys
165 170 175

Gln Phe Gly Ile Val
180

<210> 97

<211> 137

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 97

Ala Leu Gln Thr Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys
1 5 10 15

ES 2 367 749 T3

Phe Leu Ala Phe Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp
 20 25 30

Cys Ile Ser Arg Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu
 35 40 45

Asn Asp Ala Leu Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala
 50 55 60

Glu Ile Trp Leu Gly Leu Asn Asp Met Ala Ala Glu Gly Thr Trp Val
 65 70 75 80

Asp Met Thr Gly Ala Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile
 85 90 95

Thr Ala Gln Pro Asp Gly Gly Lys Thr Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser
 100 105 110

Gly Ala Ala Asn Gly Lys Trp Phe Asp Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu
 115 120 125

Pro Tyr Ile Cys Gln Phe Gly Ile Val
 130 135

<210> 98

<211> 102

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> TN-lib3-tprev

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (22) .. (23)

<223> aleatorizado

<220>

<221> misc_feature

<222> (25) .. (26)

15 <223> aleatorizado

<220>

<221> misc_feature

<222> (28) .. (29)

20 <223> aleatorizado

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (31) .. (32)
<223> aleatorizado
5 <220>
<221> misc_feature
<222> (34) .. (35)
<223> aleatorizado
<220>
10 <221> misc_feature
<222> (37) .. (38)
<223> aleatorizado
<220>
<221> misc_feature
15 <222> (40) .. (41)
<223> aleatorizado
<400> 98
      - - -
      gagatctggc tgggcctcaa cnsnsnsns nnsnsnsns nstgggtgga catgaccggt      60
      accgcacgc cctacaagaa ctgggagact gagatcaccg cg      102

<210> 99
20 <211> 94
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> TN-lib2-tprev
25 <220>
<221> misc_feature
<222> (17) .. (17)
<223> aleatorizado
<220>
30 <221> misc_feature
<222> (18) .. (18)
<223> aleatorizado
<220>
<221> misc_feature

```

<222> (20) .. (21)
 <223> aleatorizado
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (23) .. (24)
 <223> aleatorizado
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29) .. (29)
 10 <223> aleatorizado
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30) .. (30)
 <223> aleatorizado
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32) .. (33)
 <223> aleatorizado
 <400> 99

 gctgggcctc aacgacnnsn nsnnsnsgagnn snnstgggtg gacatgaccg gtaccgcat 60
 cgcctacaag aactgggaga ctgagatcac cgcg 94
 20
 <210> 100
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> TN-lib3-tpfo
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (63) .. (64)
 30 <223> aleatorizado
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (66) .. (67)
 <223> aleatorizado
 35 <220>

<221> misc_feature
 <222> (69) .. (70)
 <223> aleatorizado
 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (72) .. (73)
 <223> aleatorizado
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (75) .. (76)
 <223> aleatorizado
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78) .. (79)
 15 <223> aleatorizado
 <400> 100

 cgcggcagcg cttgtcgaac caattgcegt tggccgcgcc tgacaggacc ggcagttct 60
 csnnsnnsnn snnsnnsna tcgggttgcg cggatgctc agtctccc 108

 <210> 101
 <211> 102
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> TN-lib2-tpfo
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (63) .. (64)
 <223> aleatorizado
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (66) .. (67)
 <223> aleatorizado
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (69) .. (70)
 35 <223> aleatorizado

<220>

<221> misc_feature

<222> (72) .. (73)

<223> aleatorizado

5 <400> 101

```

cgcggcagcg cttgtcgaac cacttgccgt tggccgcgcc tgacaggacc ggcgagttct      60
csnnsnnsnn smnatcgggt tgcgcggtga tctcagttct cc                          102
    
```

<210> 102

<211> 137

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> TN3-2

<400> 102

```

Ala Leu Gln Thr Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys
 1          5          10
Phe Leu Ala Phe Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp
 20          25          30
Cys Ile Ser Arg Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu
 35          40          45
Asn Asp Ala Leu Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala
 50          55          60
Glu Ile Trp Leu Gly Leu Asn Lys Val Arg Ser Arg Tyr Phe Trp Met
 65          70          75          80
Asp Met Thr Gly Thr Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile
 85          90          95

Thr Ala Gln Pro Asp Pro Arg His Thr Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser
 100          105          110
Gly Ala Ala Asn Gly Lys Trp Phe Asp Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu
 115          120          125
Pro Tyr Ile Cys Gln Phe Gly Ile Val
 130          135
    
```

15 <210> 103

<211> 137
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> TN3-2-B
 <400> 103

Ala Leu Gln Thr Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys
 1 5 10 15
 Phe Leu Ala Phe Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp
 20 25 30
 Cys Ile Ser Arg Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu
 35 40 45
 Asn Asp Ala Leu Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala
 50 55 60
 Glu Ile Trp Leu Gly Leu Asn Lys Val Arg Ser Arg Tyr Phe Trp Met
 65 70 75 80
 Asp Met Thr Gly Thr Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile
 85 90 95
 Thr Ala Gln Pro Asp Pro Thr Asn Asn Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser
 100 105 110
 Gly Ala Ala Asn Gly Lys Trp Phe Gly Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu
 115 120 125
 Pro Tyr Ile Cys Gln Phe Gly Ile Val
 130 135

<210> 104
 <211> 137
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> TN3-2-C
 <400> 104

ES 2 367 749 T3

Ala Leu Gln Thr Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys
 1 5 10 15

Phe Leu Ala Phe Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp
 20 25 30

Cys Ile Ser Arg Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu
 35 40 45

Asn Asp Ala Leu Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala
 50 55 60

Glu Ile Trp Leu Gly Leu Asn Lys Val Arg Ser Arg Tyr Phe Trp Val
 65 70 75 80

Asp Met Thr Gly Thr Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile
 85 90 95

Thr Ala Gln Pro Asp Pro Thr Asn Arg Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser
 100 105 110

Gly Ala Ala Asn Gly Lys Trp Phe Asp Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu
 115 120 125

Pro Tyr Ile Cys Gln Phe Gly Ile Val
 130 135

<210> 105

<211> 137

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> TN3-2-D

<400> 105

ES 2 367 749 T3

Ala Leu Gln Thr Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys
 1 5 10 15

Phe Leu Ala Phe Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp
 20 25 30

Cys Ile Ser Arg Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu
 35 40 45

Asn Asp Ala Leu Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala
 50 55 60

Glu Ile Trp Leu Gly Leu Asn Lys Val Arg Ser Arg Tyr Phe Trp Ile
 65 70 75 80

Asp Met Thr Gly Thr Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile
 85 90 95

Thr Ala Gln Pro Asp Pro Asn Asn Arg Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser
 100 105 110

Gly Ala Ala Asn Gly Lys Trp Phe Gly Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu
 115 120 125

Pro Tyr Ile Cys Gln Phe Gly Ile Val
 130 135

<210> 106

<211> 181

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> TN-2-B

<400> 106

ES 2 367 749 T3

Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp
 1 5 10 15
 Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr
 20 25 30
 Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr
 35 40 45
 Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys Phe Leu Ala Phe
 50 55 60
 Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp Cys Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu Asn Asp Ala Leu
 85 90 95
 Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala Glu Ile Trp Leu
 100 105 110
 Gly Leu Asn Lys Val Arg Ser Arg Tyr Phe Trp Met Asp Met Thr Gly
 115 120 125
 Thr Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile Thr Ala Gln Pro
 130 135 140
 Asp Pro Thr Asn Asn Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser Gly Ala Ala Asn
 145 150 155 160
 Gly Lys Trp Phe Gly Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu Pro Tyr Ile Cys

165

170

175

Gln Phe Gly Ile Val
180

<210> 107

<211> 181

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> TN-2-D

<400> 107

ES 2 367 749 T3

Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp
 1 5 10 15
 Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr
 20 25 30
 Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr
 35 40 45
 Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys Phe Leu Ala Phe
 50 55 60
 Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp Cys Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu Asn Asp Ala Leu
 85 90 95
 Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala Glu Ile Trp Leu
 100 105 110
 Gly Leu Asn Lys Val Arg Ser Arg Tyr Phe Trp Ile Asp Met Thr Gly
 115 120 125
 Thr Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile Thr Ala Gln Pro
 130 135 140
 Asp Pro Asn Asn Arg Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser Gly Ala Ala Asn
 145 150 155 160
 Gly Lys Trp Phe Gly Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu Pro Tyr Ile Cys
 165 170 175
 Gln Phe Gly Ile Val
 180

<210> 108

<211> 181

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> TN-2-C

<400> 108

ES 2 367 749 T3

Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp
1 5 10 15

Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr
20 25 30

Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr
35 40 45

Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys Phe Leu Ala Phe
50 55 60

Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp Cys Ile Ser Arg
65 70 75 80

Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu Asn Asp Ala Leu
85 90 95

Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala Glu Ile Trp Leu
100 105 110

Gly Leu Asn Lys Val Arg Ser Arg Tyr Phe Trp Val Asp Met Thr Gly
115 120 125

Thr Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile Thr Ala Gln Pro
130 135 140

Asp Pro Thr Asn Arg Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser Gly Ala Ala Asn
145 150 155 160

Gly Lys Trp Phe Asp Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu Pro Tyr Ile Cys
165 170 175

Gln Phe Gly Ile Val
180

<210> 109

<211> 256

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> AD1D4-GSS-I10

<400> 109

Met Gly Ser Met Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro

ES 2 367 749 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 |
| Gly | Ser | Thr | Cys | Arg | Leu | Arg | Glu | Tyr | Tyr | Asp | Gln | Thr | Ala | Gln | Met |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Cys | Cys | Ser | Lys | Cys | Ser | Pro | Gly | Gln | His | Ala | Lys | Val | Phe | Cys | Thr |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Lys | Thr | Ser | Asp | Thr | Val | Cys | Asp | Ser | Cys | Glu | Asp | Ser | Thr | Tyr | Thr |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Gln | Leu | Trp | Asn | Trp | Val | Pro | Glu | Cys | Leu | Ser | Cys | Gly | Ser | Arg | Cys |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Ser | Ser | Asp | Gln | Val | Glu | Thr | Gln | Ala | Cys | Thr | Arg | Glu | Gln | Asn | Arg |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Ile | Cys | Thr | Cys | Arg | Pro | Gly | Trp | Tyr | Cys | Ala | Leu | Ser | Lys | Gln | Glu |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | 110 | |
| Gly | Cys | Arg | Leu | Cys | Ala | Pro | Leu | Arg | Lys | Cys | Arg | Pro | Gly | Phe | Gly |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Val | Ala | Arg | Pro | Gly | Thr | Glu | Thr | Ser | Asp | Val | Val | Cys | Lys | Pro | Cys |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Ala | Pro | Gly | Thr | Phe | Ser | Asn | Thr | Thr | Ser | Ser | Thr | Asp | Ile | Cys | Arg |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Pro | His | Gln | Ile | Cys | Asn | Val | Val | Ala | Ile | Pro | Gly | Asn | Ala | Ser | Met |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Asp | Ala | Val | Cys | Thr | Ser | Thr | Ser | Ser | Gly | Ser | Ser | Gly | Thr | Ile | Val |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| Asn | Ala | Lys | Lys | Asp | Val | Val | Asn | Thr | Lys | Met | Phe | Glu | Glu | Leu | Lys |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Ser | Arg | Leu | Asp | Thr | Leu | Ala | Gln | Glu | Val | Ala | Leu | Leu | Lys | Glu | Gln |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Gln | Ala | Leu | Gln | Thr | Val | Ser | Leu | Lys | Gly | Leu | Glu | Gln | Lys | Leu | Ile |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Ser | Glu | Glu | Asp | Leu | Asn | Ser | Ala | Val | Asp | His | His | His | His | His | His |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido trimérico que comprende tres monómeros, comprendiendo cada uno de dichos monómeros un miembro de unión específico que puede unirse a una citocina trimérica, y comprendiendo cada uno de dichos monómeros un dominio de trimerización derivado de tetranectina.
- 5 2. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 1, en el que el dominio de trimerización derivado de tetranectina comprende una secuencia que tiene al menos un 68% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de SEC ID N.º:81.
3. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 2, en el que la identidad de secuencia de aminoácidos es al menos un 75%, tal como al menos un 87%, incluyendo al menos un 92%.
- 10 4. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 1, en el que el dominio de trimerización derivado de tetranectina comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º:81.
5. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 1, seleccionado del grupo constituido por TN-2-B (SEC ID N.º:106), TN-2-C (SEC ID N.º:108), TN-2-D (SEC ID N.º:107) y AD1D4-GSS-I10 (SEC ID N.º:109).
- 15 6. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 1, en el que la citocina trimérica es un miembro de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral.
7. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 6, en el que el miembro de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral se selecciona del grupo que consiste en LTA; TNF; LTB; TNFSF4; TNFSF5; TNFSF6; TNFSF7; TNFSF8; TNFSF9; TNFSF10; TNFSF11; TNFSF12; TNFSF13; TNFSF13B; TNFSF14; TNFSF15; y TNFSF18.
- 20 8. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 6, en el que el miembro de unión específico es un polipéptido derivado de un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral.
9. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 6, en el que el miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral se selecciona del grupo que consiste en TNFRSF1A, TNFRSF1B, LTBR, TNFRSF4, TNFRSF5, TNFRSF6, TNFRSF6B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFRSF12, TNFRSF12L, TNFRSF13B, TNFRSF13C, TNFRSF14, TNFRSF F_n14, NGFR, TNFRSF17, TNFRSF18, TNFRSF19, TNFRSF19L, TNFRSF21, TNFRSF22 y TNFRSF23.
- 25 10. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 1, en el que el miembro de unión específico se deriva de TNFRSF1A (receptor p55 TNF).
11. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 1, en el que el miembro de unión específico se deriva de TNFRSF1B (receptor p75 TNF).
- 30 12. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 11, en el que el miembro de unión específico es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en TNFRSF1B 1-235 (SEC ID N.º:76), TNFRSF1B 1-185 (SEC ID N.º:77), TNFRSF1B 1-163 (SEC ID N.º:78) y TNFRSF1B 1-142 (SEC ID N.º:79).
13. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 11, en el que el miembro de unión específico es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en TNFRSF1B D1D2 (SEC ID N.º:13), TNFRSF1B D1D2, 1/6 (SEC ID N.º:15), TNFRSF1B D1D2 1/4 (SEC ID N.º:17), TNFRSF1B D1D2, 1/3 (SEC ID N.º:19), TNFRSF1B D1D2, 1/2 (SEC ID N.º:21), TNFRSF1B D1D4 (SEC ID N.º:23), TNFRSF1B D2 (SEC ID N.º:25), TNFRSF1B D2, 1/6 (SEC ID N.º:26), TNFRSF1B D2, 1/4 (SEC ID N.º:27), TNFRSF1B D2, 1/3 (SEC ID N.º:28), TNFRSF1B D2, 1/2 (SEC ID N.º:29) y TNFRSF1B D2D4 (SEC ID N.º:30).
- 35 14. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 1, en el que el miembro de unión específico es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
15. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a TNF humano (SEC ID N.º:80) en al menos una región seleccionada de las regiones constituidas por residuos de aminoácidos 1-18, 1-20, 1-26, 1-30, 12-22, 22-31, 22-40, 36-45, 49-97, 49-98, 56-79, 58-65, 69-97, 70-87, 76-90, 96-105, 105-128, 108-128, 110-127, 115-125, 117-128, 132-157, 135-155, 136-153, 138-149, 141-153 y 146-157.
- 45 16. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se selecciona de MAb 1 (ECACC 89080301), MAb 21 (ECACC 90012432), MAb 25 (ECACC 89121401), MAb 32 (ECACC 89080302), MAb 37 (ECACC 89080303), MAb 42 (ECACC 89080304), MAb 47 (ECACC 89121402), MAb 53 (ECACC 90012433) y MAb 54 (ECACC 89083103) o un fragmento del mismo.
- 50 17. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo es D2E7 o un fragmento del mismo.
18. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo es CDP 870 o un fragmento del

mismo.

19. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 1, en el que el miembro de unión específico es una proteína que tiene la estructura de armazón proteínico de dominios similar a lectina de tipo C (CTLD).

5 20. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 19, en el que el miembro de unión específico que tiene la estructura de armazón proteínico de dominios similar a lectina de tipo C se selecciona del grupo que consiste en TN3-2-B (SEC ID N.º:103), TN3-2-C (SEC ID N.º:104) y TN3-2-D (SEC ID N.º:105).

21. Un polipéptido trimérico según la reivindicación 1, que comprende además un ligador entre el miembro de unión específico y el dominio de trimerización.

10 22. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido trimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1-21.

15 23. Un procedimiento para la preparación de un polipéptido trimérico que comprende tres monómeros, comprendiendo cada uno de dichos monómeros un miembro de unión específico que puede unirse a una citocina polipeptídica trimérica, y comprendiendo cada uno de dichos monómeros un dominio de trimerización según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de (i) cultivar un huésped transformado con un vector que codifica dicho polipéptido trimérico en condiciones tales que se expresa dicho polipéptido trimérico; y (ii) aislar dicho polipéptido trimérico.

24. Un procedimiento según la reivindicación 23, en el que dicho miembro de unión específico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en TNFRSF1B 1-235 (SEC ID N.º:76), TNFRSF1B 1-185 (SEC ID N.º:77), TNFRSF1B 1-163 (SEC ID N.º:78) y TNFRSF1B 1-142 (SEC ID N.º:79).

20 25. Un procedimiento según la reivindicación 23, en el que el miembro de unión específico es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en TNFRSF1B D1D2 (SEC ID N.º:13), TNFRSF1B D1D2, 1/6 (SEC ID N.º:15), TNFRSF1B D1D2 1/4 (SEC ID N.º:17), TNFRSF1B D1D2, 1/3 (SEC ID N.º:19), TNFRSF1B D1D2, 1/2 (SEC ID N.º:21), TNFRSF1B D1D4 (SEC ID N.º:23), TNFRSF1B D2 (SEC ID N.º: 25), TNFRSF1B D2, 1/6 (SEC ID N.º:26), TNFRSF1B D2, 1/4 (SEC ID N.º:27), TNFRSF1B D2, 1/3 (SEC ID N.º: 28), TNFRSF1B D2, 1/2 (SEC ID N.º:29) y TNFRSF1B D2D4 (SEC ID N.º:30).

26. Un polipéptido trimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, para su uso como medicamento.

27. Un polipéptido trimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, para el tratamiento de una enfermedad mediada por citocina trimérica.

30 28. Uso de un polipéptido trimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad mediada por citocina trimérica.

29. Un procedimiento de ensayo para detectar una citocina trimérica en una muestra que comprende (i) poner en contacto dicha muestra con un polipéptido trimérico según la reivindicación 1, y (ii) detectar la unión del polipéptido trimérico a la citocina trimérica.

35

Figura 1

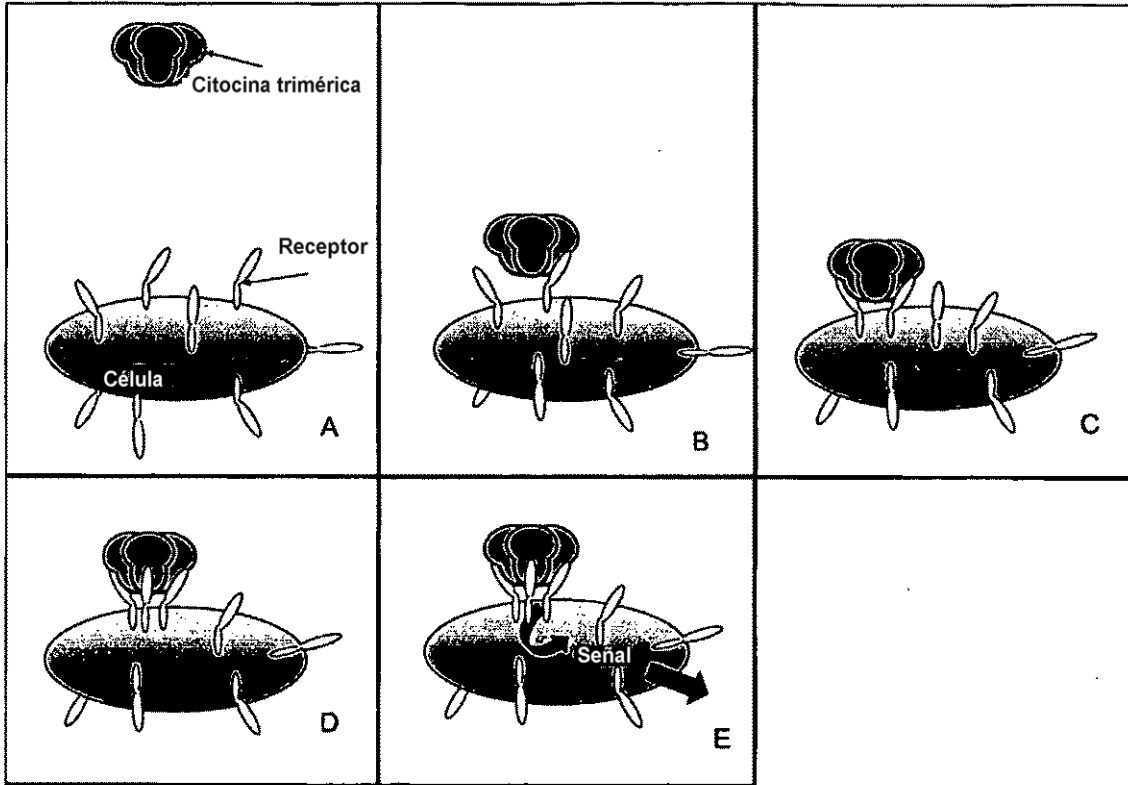


Figura 2

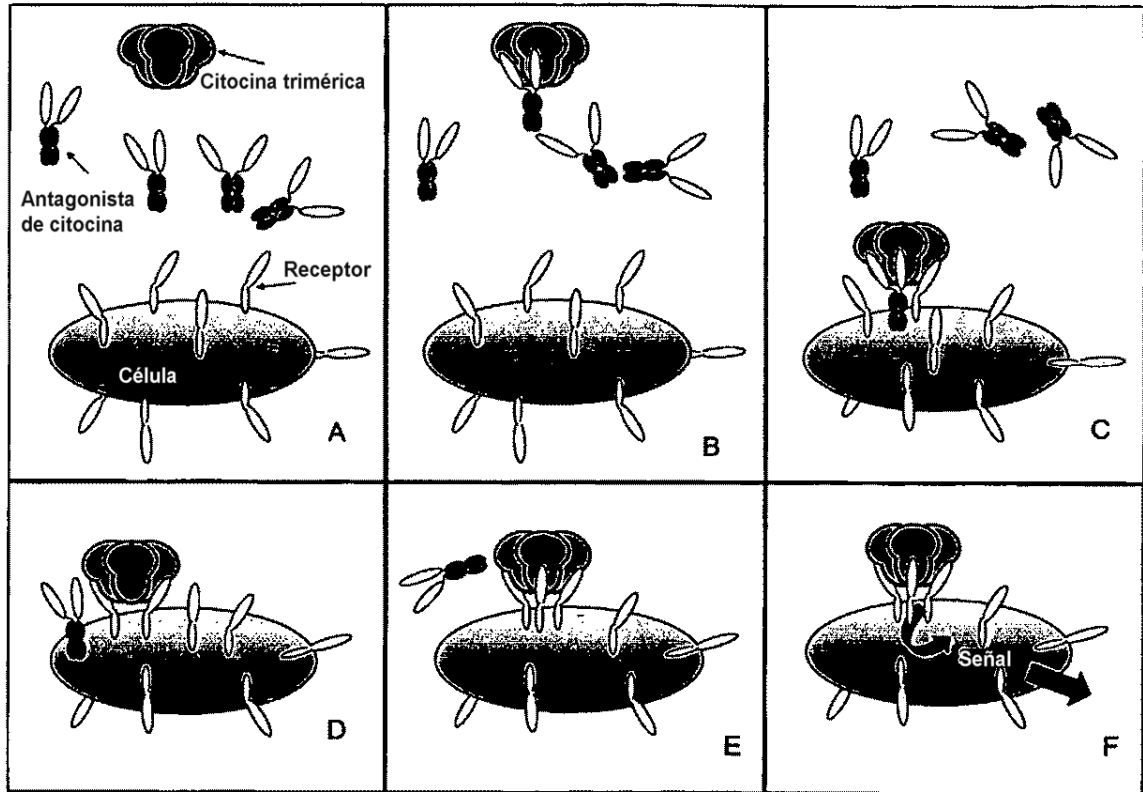


Figura 3

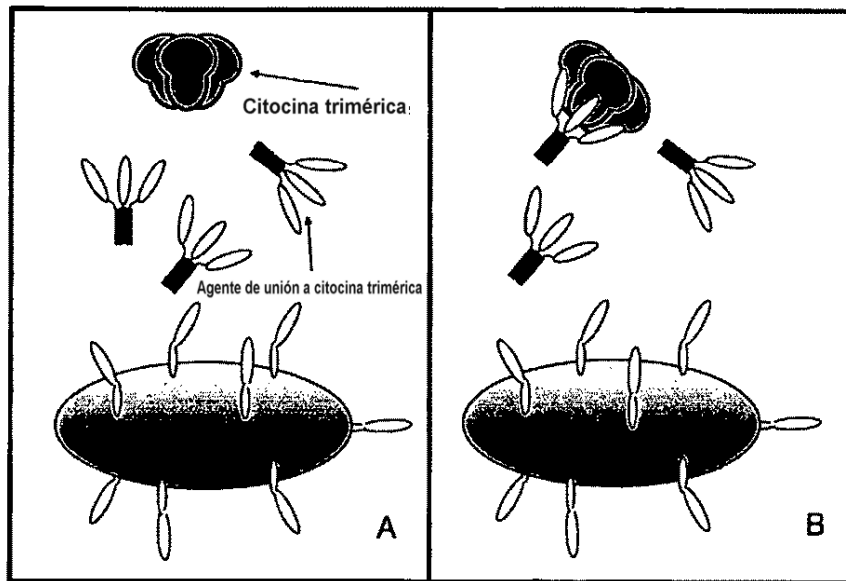


Figura 4

